

ЗАТВЕРДЖЕНО
Наказ Міністерства освіти і науки,
молоді та спорту України
29 березня 2012 року №384

Форма № Н-9.02

**Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С.З. Гжицького**

Факультет харчових технологій та біотехнології

(повна назва факультету)

Кафедра біотехнологій та радіології

(повна назва кафедри)

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня магістра

**на тему: «Обґрунтування молекулярно-генетичних
механізмів загибелі організму на підставі оптимізованого
цитогенетичного аналізу»**

Виконав(ла): студент(ка) 2 курсу,
групи , спеціальності
162 «Біотехнологія та біоінженерія»

Макарук І.О.

(прізвище та ініціали)

Керівник Шемедюк Н.П.

(прізвище та ініціали)

Рецензент

(прізвище та ініціали)

Робота заслухана на засіданні кафедри біотехнології та радіології і
рекомендована до захисту в ДЕК, протокол № від 2023 р.

Завідувач кафедри біотехнології та радіології

Буцьяк Василь Іванович

Львів – 2023

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	4.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5.
ВСТУП.....	6.
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	10.
1.1. Поняття «мутація», «мутагени» та їх класифікація.....	10.
1.2. Молекулярні механізми виникнення мутацій та їх значення для біотехнології.....	14.
1.3. Генетичні захворювання людини.....	18.
1.3.1. Синдром Дауна.....	21.
1.3.2. Синдром Клайнфельтера.....	24.
1.3.3. Синдром Патау.....	27.
1.3.4. Синдром Шерешевського-Тернера.....	30.
1.3.5. Синдром Едвардса.....	34.
1.3.6. Триплоїдія.....	38.
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	41.
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	41.
2.1. Схема експерименту та об'єкт дослідження.....	41.
2.2. Витратні матеріали, реактиви та обладнання необхідні для дослідження.....	42.
2.3. Підготовка розчинів.....	44.
2.4. Методи дослідження.....	45.
2.4.1. Метод культивування клітин амніотичної рідини для цитогенетичного аналізу хромосомного набору плоду без CO ₂ інкубатора (непрямий метод).....	45.
2.4.1.1. Посадка та культивування клітин амніоцитів.....	45.
2.4.1.2. Фіксація клітинної культури амніоцитів.....	46.
2.4.1.3. Виготовлення хромосомних препаратів.....	47.

2.4.2. Прямий метод дослідження ворсин хоріона та плаценти.....	47.
2.4.2.1. Фіксація клітин ворсин хоріона.....	47.
2.4.2.2. Виготовлення хромосомних препаратів.....	48.
2.4.3. Забарвлення хромосомних препаратів GTG-методом та їх аналіз.....	48.
2.4.4. Статистична обробка даних.....	49.
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	50.
3.1. Оптимізація цитогенетичного пренатального аналізу (ЦГА) в амніотичній рідині.....	50.
3.2. Дослідження частоти та спектру аномалій каріотипу ембріона у клітинах ворсин хоріону після мимовільно втрачених вагітностей (МВВ) методом ЦГА.....	52.
3.3. Дослідження частоти та спектру аномалій каріотипу плода у біологічному матеріалі під час інвазивної діагностики методом ЦГА.....	56.
3.4. Аналіз корелятивних зв'язків між ймовірністю отримання аномального каріотипу плода та виду досліджуваного біологічного матеріалу.....	59.
ВИСНОВКИ.....	63.
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	64.

АНОТАЦІЯ

У даній роботі розглянуто поняття про мутації та механізми їх виникнення. Також описано класифікацію генетичних захворювань, механізм виникнення та основні ознаки. Детально описані методики культивування амніотичної рідини та прямий метод аналізу клітин ворсин хоріону та плаценти у пренатальній інвазивній діагностиці та завмерлих вагітностях. Дослідження частота та спектри аномалій каріотипу жінок у клітинах ворсин хоріону ембріона після мимовільно втрачених вагітностей та у біологічному матеріалі під час інвазивної діагностики методом цитогенетичного дослідження. Проаналізовано корелятивні зразки між ймовірністю дослідження аномального каріотипу та виду досліджуваного біологічного матеріалу.

Ключові слова: мутації, цитогенетичний аналіз, амніотична рідина, біоптат ворсин хоріону, зразки клітини плаценти, абортівний матеріал.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

УЗД – ультразвукове дослідження

ISCN – міжнародна система для номенклатури в цитогенетиці людини (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature)

ЦГА – цитогенетичний аналіз

ММВ – мимовільний викидень

ВСТУП

Аналіз нинішньої соціально-демографічної ситуації в Україні свідчить про глибоку демографічну кризу, яка склалася внаслідок соціально-економічних проблем, військових дій, поширення соціально значущих захворювань серед населення. У зв'язку з цим, покращення репродуктивного здоров'я людини,

За даними Міністерства охорони здоров'я України майже кожна п'ята бажана вагітність завершується мимовільним викиднем (ММВ), з них 75-80% трапляються у ранні терміни. Показано, що майже 60% зигот людини елімінується на пре- та ранніх післяімплантаційних стадіях ембріогенезу [Allison J.L., 2009]. Вагомим генетичним чинником ММВ насамперед є порушення хромосомного набору ембріону, які спричиняють до 60% випадків ранніх замерлих вагітностей/мимовільних викиднів [van den Berg M.M., 2012; Goddijn M., 2000; Jurkovic D., 2013; Gimovsky A.C., 2018]. У структурі аномалій каріотипу при РРВ переважну більшість складають чисельні (кількісні) хромосомні патології: трисомії по аутосомних хромосомах (60 %), моносомії по Х-хромосомі (20 %) та інша анеуплоїдія; 15% аномалій каріотипу припадає на поліплоїдію, в переважній більшості триплоїдію [Goddijn M., 2000; Simpson J.L., 2007; Jurkovic D., 2013; Jenderny J. , 2014; Soler, A., 2017; Pylyp L.Y., 2018]. Незважаючи на багато досліджень щодо хромосомних порушень ембріону у разі ММВ, їхня поширеність і структура значно варіюють, тому актуальним науковим завданням є аналіз хромосомної патології при ранніх втратах вагітності у різних популяціях.

Відомо, що чисельні хромосомні аномалії, зазвичай, є новими мутаціями. Однак, на фоні різнопланового вивчення внеску окремих екзо- та ендогенних факторів у виникнення порушень каріотипу *de novo*, проблема залишається відкритою. Дослідження молекулярно-генетичних механізмів загибелі організму людини на ранніх етапах ембріогенезу продовжується, тому кожні нові відомості щодо поширеності хромосомної патології при ранніх втратах вагітності є важливими.

Велику питому вагу займають хромосомні порушення плода і серед вагітностей, що розвиваються. Наразі немає іншого способу допологової діагностики такої патології, ніж масові безвибіркові обстеження вагітних жінок (скринінги), і проведення у сформованих групах високого ризику інвазивної діагностики з наступним цитогенетичним дослідженням каріотипу плода. Однак, доступність інвазивних маніпуляцій (амніоцентез, плацентоцентез, біопсія хоріону) в Україні недостатня, і це переважно зумовлено труднощами із проведенням цитогенетичного аналізу амніотичної рідини. Часто перешкодою для впровадження такого методу в лабораторіях державних закладів є брак високоякісної апаратури та реагентів. Тому ще однією важливою науково-практичною проблемою є удосконалення і оптимізація методики культивування амніотичної рідини, щоб зробити її більш економічною, доступною та ефективною.

Таким чином, незважаючи на численні багаторічні дослідження у галузі цитогенетики людини, все більше розуміння молекулярних механізмів утворення генетичних порушень, розробку новітніх генетичних технологій, частота хромосомної патології в українській популяції залишається стабільно високою. Це свідчить про необхідність продовження досліджень у напрямку удосконалення цитогенетичних методів, які використовуються на пре- та постнатальному періоді розвитку людини.

У зв'язку з цим, **актуальність** даної теми магістерської роботи, що полягає в оптимізації цитогенетичних методів аналізу хромосомних патологій людини і зниження завдяки цьому важелю генетичної патології в популяції, не викликає сумнівів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами: Магістерська робота відповідає основному плану науково-дослідницьких робіт Медико-біологічного центру «Геном». Робота виконувалася також у рамках співпраці МБЦ «Геном» як клінічної бази кафедри акушерства, гінекології та перинатології НУОЗ України імені П.Л. Шупика з виконання НДР на тему: «Актуальні аспекти охорони репродуктивного здоров'я жінок,

прегравідарної підготовки та пренатальної діагностики в сучасних умовах»,
№державної реєстрації: 0117U006095.

Мета дослідження: вивчити структуру каріотипу ембріонів/плодів у матеріалі ранніх репродуктивних втрат та пренатальної інвазивної діагностики вагітних жінок із центрального регіону України, і на підставі отриманих даних обґрунтувати можливі біологічні механізми загибелі організму на ранніх етапах внутрішньоутробного розвитку.

Завдання дослідження:

1. Оптимізувати стандартну методику культивування амніоцитів.
2. Проаналізувати частоту та спектр аномалій каріотипу ембріонів у матеріалі ранніх репродуктивних втрат за 2022-2023 роки.
3. Дослідити частоту та спектр аномалій каріотипу плода за результатами пренатальної інвазивної діагностики за 2022-2023 роки.
4. Оцінити ймовірності отримання нормального або патологічного каріотипу залежно від типу біологічного матеріалу.

Об'єкт дослідження: цитогенетичний аналіз, метафазні хромосоми клітин різного біологічного матеріалу.

Предмет дослідження: оптимізація цитогенетичного аналізу, хромосомні мутації.

Методи дослідження: культивування клітин, цитогенетичний аналіз, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів: Визначено частоту аномальних каріотипів ембріону при ранніх втратах вагітності, яка склала у 2022 році 67%, у 2023 році – 71%. Показано, що у структурі хромосомної патології переважали аутосомна анеуплоїдія – 31% та 33%, поліплоїдія – 13,5% та 12%, анеуплоїдія статевих хромосом – 12% та 8,6%.

Встановлено, що аномалії каріотипу плода при вагітностях, що розвивалися, були істотно меншими і склали у 2022 році 33%, у 2023 році – 20%. У структурі патології також переважала аутосомна анеуплоїдія – 16,4% та 33%

Доведено, що ймовірність знайти патологічний каріотип залежить від типу біологічного матеріалу і є значуще вищою в матеріалі рано втрачених вагітностей порівняно з вагітностями, що розвиваються ($p < 0,05$). Хромосомні мутації триплоїдія, трисомія 13, трисомія 18 та трисомія 16 є летальними і призводять до елімінації ембріонів на ранніх етапах внутрішньоутробного розвитку.

Практичне значення одержаних результатів: розроблено оптимізовану методику культивування амніоцитів без високовартісного CO₂ інкубатора, що значно здешевлює собівартість цитогенетичного аналізу. Така методика може широко використовуватися у цитогенетичних лабораторіях України. Встановлення хромосомної природи ранніх втрат вагітності дозволяє покращити надання допомоги парам із репродуктивними розладами і сприяє покращенню демографічної ситуації.

Апробація результатів дослідження: Використання культури лімфоцитів у цитогенетичному аналізі: матеріали студ. наук. конф. (м. Львів, 10-11 листопада 2022р.) / Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнології імені С.З. Гжицького. – Львів: Сучасні технології з використанням біотехнологій, 2022. – 101-103 с.

Міжнародна система цитогенетичної номенклатури людини: матеріали студ. наук. конф. (м. Львів, 10-11 листопада 2022р.) / Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнології імені С.З. Гжицького. – Львів: Сучасні технології з використанням біотехнологій, 2022. – 109-111 с.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Поняття «мутація», «мутагени» та їх класифікація

Мутація - це постійна та спадкова зміна генетичного матеріалу, яка може призвести до фенотипових змін та зміни функції білка. Мутагенез ДНК відбувається спонтанно в природі або під впливом мутагенів (речовин, що мають здатність змінювати ДНК). Мутагенез є рушійною силою еволюції, але він також може призводити до раку та спадкових захворювань[1].

За характером змін у генетичному апараті мутації поділяють на три групи, такі як: геномні, хромосомні та генні. Геномні мутації – це кількісні мутації хромосомного набору у каріотипі організму, що виникають внаслідок порушень нормального перебігу процесів мітозу та мейозу. Геномні мутації можна розділити на дві групи: повторювані мутації, в яких розмір делеції або дублювання є схожим від людини до людини та мутації, які відбуваються завдяки більш складних механізмів[2]. Хромосомними називають мутації, що виникають внаслідок перебудови в межах однієї або при залученні двох і більше хромосом. До таких мутацій відносяться інверсії, делеції, дуплікації, інсерції та транслокації. Генні мутації виникають в результаті зміни молекулярної структури ДНК чи рибонуклеїнової кислоти або при цитологічно непомітних хромосомних мікроаберацій [2,3].

Існуює три фактори, які збільшують ймовірність мутації, а саме: хімічні, фізичні та біологічні. Мутагени змінюють хімічну структуру ДНК-основи або викликають розриви в ланцюжку ДНК.[5] Деякі мутації спричиняють дезамінування, наприклад, перетворення цитозину на урацил, що призводить до перехресного зшивання двох ниток ДНК. Інший клас мутацій пов'язаний з утворенням вільних радикалів у ядрі, що призводить до розриву нитки ДНК. Йонізуюче випромінювання та ультрафіолетове випромінювання є двома основними фізичними мутагенами. Йонізуюче випромінювання може діяти прямо або опосередковано шляхом збільшення кількості вільних радикалів у

клітині. Результатом може бути безліч різноманітних мутацій, включно з генними мутаціями і розривами ниток ДНК. Основним впливом ультрафіолетового опромінення є димеризація сусідніх основ тиміну, що може призвести до делеційної мутації[1].

Біологічні чинники також можуть пришвидшити виникнення мутації. Пізній батьківський вік є фактором ризику народження дитини з генетичним порушенням через нову мутацію. Пізній материнський вік не має схожих ризиків, хоча існує підвищена ймовірність хромосомної нерозбіжності. Ризик мутацій, пов'язаних із віком, зумовлений тим фактом, що чоловічі статеві клітини піддаються мітотичному поділу, починаючи зі статевого дозрівання і продовжуючи все життя, а ооцити доповнюють усі їхні мітотичні поділи під час життя плоду. Кожен етап реплікації ДНК являє собою можливість помилок, які призводять до мутації, тому чим старший батько, тим більше мутацій може накопичитися в зародкових клітинах [3].

Існують різні типи мутацій, такі як тихі, помилкові, некоректні і мутації зсуву рамки зчитування.

Тиха мутація - це заміна нуклеотиду, який кодує ту саму амінокислоту, тому не відбувається жодних змін у послідовності амінокислот або функції білка.

Помилкова мутація - це коли заміна нуклеотидів призводить до зміни амінокислоти. Мутації мають різні наслідки, але можуть призвести до зниження або зміни функції білка (наприклад, серповидно-клітинна анемія) [4].

Некоректна мутація - це послідовність заміни нуклеотидів, що призводить до появи нового стоп-кодону. Такі білкові утворення є скороченими і часто нефункціональними (наприклад, при муковісцидозі) [5].

Мутація зсуву рамки зчитування відбувається у зв'язку додавання або видалення нуклеотидів, які кратні трьом, що призводить до неправильного зчитування наступних нуклеотидів. Ці білки можуть бути коротшими або довшими, а функція білка може бути порушена або змінена (наприклад, м'язова дистрофія Дюшена) [6].

Інші типи мутацій не стосуються структурних генів. До них відносяться мутації промоторної, ехансерної послідовностей, а також мутації термінуючої ділянки. Наприклад, при деяких формах В-таласемії мутована ділянка сплайсингу призводить до того, що в організмі використовуються приховані місця сплайсингу, що спричиняє порушення синтезу В-глобіну [7].

Мутагени – це мутації спричинені хімічними та фізичними чинниками. До хімічних мутагенів відносяться різні хімічні сполуки такі як: вільні радикали, інгібітори синтезу нуклеїнових кислот, окиснювачі, алкілюючі сполуки, аналоги азотистих основ та інші. Низькі та високі температури, різні види випромінювання (рентгенівське, ультрафіолет, гамма-випромінювання та інші), нейтрони відносяться до фізичних факторів.

Мутагенез має численні наслідки в клінічній медицині. Зокрема канцерогенез, спадкові захворювання, резистентність мікроорганізмів, масштабні мутагенні дослідження та точну медицину.

Канцерогенез (тобто пухлиноутворення або онкогенез) - це процес при якому клітина починає неконтрольовано ділитися. Мутації онкогенів (які сприяють росту клітини), генів-супресорів пухлин (які пригнічують ріст клітин) або генів клітинного циклу (які регулюють клітинний цикл) можуть призвести до утворення клональної популяції клітин з високими проліферативними властивостями, що призводить до раку [9]. Приблизно дві третини мутацій, що призводять до виникнення раку, пов'язані зі спонтанним мутагенезом, який відбувається під час нормальної реплікації ДНК [10]. Крім того, відомо багато факторів, які пов'язані з канцерогенезом. Наприклад, Тютюн містить метилуючі сполуки ДНК, алкілюючі сполуки, поліциклічні ароматичні вуглеводні та N-нітрозаміни. Доведено, що куріння тютюну збільшує ризик виникнення багатьох видів раку, включаючи рак легенів, товстої кишки, голови та ший, а також нижніх сечовивідних шляхів [6,9,11].

Йонізуюче випромінювання, як наслідок атомної радіації (наприклад, Чорнобиль) або ядерних причин, пов'язане з папілярною карциномою щитовидної залози. При папілярній карциномі щитовидної залози йонізуюче

випромінювання збільшує швидкість перебудов ДНК, які спричиняють постійну активність промоторної ділянки *ret*, тирозинкінази [12].

Спадкові захворювання беруть свій початок у мутагенезі, оскільки це постійні зміни ДНК, які передаються нащадкам. Деякі приклади спадкових захворювань включають серповидно-клітинну анемію, хворобу Тея-Сакса, муковісцидоз, хворобу Гантінгтона, м'язову дистрофію Дюшена, гемофілію та інші. Добре вивченим прикладом є серповидно-клітинна анемія. Це аутосомно-рецесивне захворювання, що виникає внаслідок помилкової мутації в гені В-глобіну (тобто точкової мутації, що призводить до заміни глютамінової кислоти на валін). Дослідження показують, що ця мутація створює адаптаційну перевагу у гетерозиготних носіїв в малярійно-ендемичних районах [5], однак гомозиготне успадкування має поганий прогноз через підвищений ризик анемії, інфекції, інсульту та пошкодження органів [8].

Масштабні методи мутагенезу можна використовувати для визначення функціонально важливих амінокислотних залишків, які впливають на певні фенотипи. Наприклад, дослідження на мишах білка Golgi GMAP-210 показало, що зміна гена викликає фенотип, який нагадує людський ахондрогенез типу 1А. Це допомогло виявити подібну мутацію у людей [9].

Персональна медицина - це концепція, в якій лікування захворювань ґрунтується на знанні аномалій геному людини, що стало актуальним після того, як секвенування всього геному стало більш доступним. Персональна медицина залежить від нових терапевтичних стратегій, розробки ліків та генно-орієнтованого лікування [4]. Наприклад, генно-орієнтовані методи, такі як *CRISPR/Cas9* і *TALEN*, можуть одного дня знайти клінічне застосування. *CRISPR* досліджується для лікування мутацій одного гена (наприклад, муковісцидозу), ВІЛ та раку [12].

1.2. Молекулярні механізми виникнення мутацій та їх значення для біотехнології

Мутації виникають внаслідок помилок реплікації ДНК, пошкодження ДНК та внаслідок лабораторних досліджень. Причинами мутагенезу можна розділити на ендогенні та екзогенні.

До ендогенних відносяться:

1. Помилки в реплікації ДНК. Деякі помилки виникають через порушення реплікації на повторюваних послідовностях, що може призвести до інсерцій і делецій. Якщо ці помилки не будуть виправлені до наступного етапу реплікації ДНК, виникне мутація [13,17].

2. Помилки в механізмах репарації ДНК. Існує декілька механізмів репарації ДНК, а саме: репарація вирізання основ, репарація вирізання нуклеотидів, транслокаційний синтез, гомологічну рекомбінацію та негомологічне з'єднання кінців. Якщо будь-який з цих механізмів репарації виходить з ладу, клітина схильна до пошкодження ДНК [17,18].

3. Спонтанне дезамінування основ. Дезамінування основ - це коли основа нуклеотиду втрачає амінову групу, фактично змінюючи нуклеотид. Основні реакції дезамінування: цитозин до урацилу, аденін до гіпоксантину, гуанін до ксантину і 5-метилцитозин до тиміну. Якщо ці зміни не репаруються, може відбутися порушення послідовності ДНК [17].

4. Окислювальне пошкодження ДНК. У нормальній клітинній фізіології активні форми кисню є побічним продуктом електронно-транспортного ланцюга та інших клітинних процесів. Активна форма кисню виконує важливі клітинні функції, включаючи окислювально-відновну сигналізацію та імунний захист. Однак у великих кількостях активна форма кисню руйнує клітину та її ДНК [17].

5. Метилування основ. S-аденозилметіонін - це молекула, яка використовується як донор метилу під час фізіологічного метилування ДНК. У

концентрації 4×10^{-5} М S-аденозилметіонін може генерувати понад 4 000 змін метильованих основ на клітину за добу [17,14].

6. Амінокислотні ділянки (тобто апуринові та апіримідинові ділянки). Щодня в результаті спонтанного гідролізу або розщеплення ДНК глікозилазою утворюється приблизно 10 000 амінокислотних ділянок. Амінокислотні ділянки нестабільні і зазвичай видаляються ендонуклеазами. В інших випадках вони відновлюються за допомогою транслокаційних полімераз. Якщо ці ділянки не виправляти, вони можуть призвести до мутагенезу [17,15].

До екзогенних відносять:

1. Йонізуюче випромінювання. Йонізуюче випромінювання надходить з ґрунту, радону, медичних приладів, космічного випромінювання тощо. Воно може пошкоджувати ДНК безпосередньо (наприклад, розриви ланцюгів ДНК) або опосередковано (наприклад, радіоліз молекул води з утворенням активної форми кисню). Йонізуюче випромінювання може спричинити низку пошкоджень нуклеотидних основ, що призводить до мутагенезу [17].

2. Ультрафіолетове випромінювання. Ультрафіолетове випромінювання має довжину хвилі від 100 до 400 нм, причому найбільш шкідливим є випромінювання з меншою довжиною хвилі. Ультрафіолетове випромінювання пошкоджує ДНК шляхом прямої та непрямої (до сусідніх молекул) передачі енергії. Двома основними продуктами пошкодження ДНК ультрафіолетовим випромінюванням є піримідинові димери та піримідин-піримідонові фотопродукти [17].

3. Алкілюючі агенти та ароматичні аміни. Алкілюючі агенти (наприклад, азотний іприт, метилметансульфонат, етилметансульфонат, N-етил-N-нітросечовина) мають високу спорідненість до нітрогенів на нуклеотидних основах, переважно до N3 аденіну і N7 гуаніну. Ароматичні аміни (наприклад, 2-амінофлуорен, який раніше використовувався в інсектицидах) метаболізуються системою *CYP450* і перетворюються на алкілюючі агенти. Ці продукти спричиняють пошкодження C8 положення гуаніну. Відомо, що

пошкодження С8-гуаніну призводять до заміни основ і мутацій зі зсувом рамки відтворення [17].

4. Поліциклічний ароматичний вуглеводень. Поліциклічні ароматичні вуглеводні (наприклад, дибензопірен, нафталін, антрацен і пірен) - це вуглецеві сполуки з двома або більше ароматичними кільцями. Вони зазвичай присутні в тютюновому димі, автомобільних вихлопах, обвугленій їжі, продуктах згорання природного палива та органічних речовинах. Ферменти *CYP450* перетворюють поліциклічні ароматичні вуглеводні на реакційноздатні проміжні продукти ДНК, які вбудовуються в ДНК, утворюючи в кінцевому підсумку адукт ДНК (сегмент ДНК, зв'язаний з хімічною речовиною, що викликає рак). Це призводить до пошкодження ДНК і, таким чином, може спричинити мутагенез [17].

5. Зшивання. Зшивання відбувається, коли два нуклеотиди утворюють ковалентний зв'язок. Агенти, які зазвичай асоціюються зі зшиванням, включають циклофосфамід, цисплатин і псорален. Міжланцюгове зшивання блокує реплікацію ДНК, і це вимагає репарації або обходу. Транслокаційний синтез є одним з таких механізмів репарації і асоціюється з високими темпами заміни [17,16].

6. Інсерційний мутагенез. Інсерційний мутагенез може бути природним, опосередкованим транспозонами або вірусами, або здійсненим в лабораторії. Оскільки відбувається додавання нуклеотидів, інсерційний мутагенез зазвичай призводить до мутацій зсуву рамки зчитування [18].

7. Інші токсини: Афлатоксин - це природний токсин, що походить від золотистого стафілокока. Система *CYP450* метаболізує афлатоксин в активну форму, яка приєднується до N7 гуаніну, що призводить до депуринування. Афлатоксин є добре відомим канцерогеном печінки, який асоціюється з гепатоцелюлярною карциномою. N-нітрозаміни - органічні сполуки, які часто зустрічаються в тютюновому димі, консервованому м'ясі та навколишньому середовищі. Вони метаболізуються системою *CYP450* з утворенням алкілюючих агентів ДНК. N-нітрозаміни причетні до захворювань носоглотки, стравоходу та шлунку [17,18].

8. Лабораторні методи. Для ініціювання мутагенезу використовують різні лабораторні методи, зокрема ПЛР, не-ПЛР та методи редагування генів [14].

Порушення, коли клітина містить більше двох повних наборів гаплоїдного геному людини (69 хромосом або більше), називається поліплоїдією. Триплоїдія (три гаплоїдні набори хромосом) зустрічається в 1-3% вагітностей і зазвичай виникає внаслідок запліднення однієї яйцеклітини двома сперматозоїдами або іноді внаслідок запліднення диплоїдною гаметою (яйцеклітиною або сперматозоїдом). Життєздатність триплоїдних плодів зазвичай дуже низька і призводить до мимовільних абортів на ранніх термінах вагітності, тоді як тетраплоїдія (чотири гаплоїдні набори хромосом) зустрічається ще рідше і є несумісною з життям. Однак ситуація, коли число хромосом не є точним кратним числу гаплоїдних хромосом, називається анеуплоїдією [18].

Анеуплоїдія зазвичай виникає через те, що утворюється гамета, яка містить більше або менше хромосом, ніж нормальний набір. Це відбувається внаслідок нерозходження, коли репліковані хромосоми не розділяються належним чином під час поділу клітини. Також може статися як під час мейозу I (нерозходження парних хромосом) та під час мейозу II (нерозходження сестринських хроматид) [15]. В результаті нерозходження утворюються статеві клітини, які або містять додаткову копію однієї з хромосом, або в них відсутня одна хромосома. Запліднення призводить до утворення зиготи з додатковою хромосомою або відсутньою хромосомою відповідно. Найчастіше нерозходження відбувається під час мейозу II утворення яйцеклітини і залежить від віку матері та інших факторів навколишнього середовища [16]. Ризик народження трисомічного плоду зростає з 1,9% у жінок віком 25-29 років до понад 19% у жінок віком понад 39 років. Існують також докази того, що дефіцит фолієвої кислоти, куріння, ожиріння та опромінення низькими дозами радіоактивних забруднювачів підвищують ризик нерозходження [13,16].

Більшість анеуплоїдій є летальними. Наявність додаткової аутосоми, як правило, призводить до тяжких аномалій розвитку, і лише трисомії невеликих,

бідних на гени хромосом є толерантними. Аутомні моносомії мають ще більш тяжкі наслідки, оскільки вони незмінно призводять до викиднів на ранніх термінах вагітності. Наслідки розвитку таких трисомій і моносомій є результатом дисбалансу рівнів критичних генних продуктів, закодованих на уражених хромосомах.

У біотехнології мутаційні процеси використовують для прискорення процесів селекції. Методами генної інженерії вважають: розмноження та копіювання виділених або синтезованих генів; синтез генів поза організмом; поєднання різних геномів у одній клітині; виділення із клітини фрагментів хромосом, окремих генів або клітинних ядер та інших органел. У рослинництві більш поширилися методи клітинної інженерії, а саме: культивування незрілих зародків, мікроклональне розмноження, соматоклональна мінливість та оздоровлення рослин від вірусів.

1. 3. Генетичні захворювання людини

Майже кожна клітина людини містить повний диплоїдний геном, що складається з 2 метрів ДНК, розташованих у 46 хромосомах: 22 гомологічних аутомних пар і статевих хромосом, що складаються з двох X-хромосом у жінок і X та Y у чоловіків. Виняток становлять без'ядерні клітини, такі як еритроцити (червоні кров'яні тільця), фрагменти клітин (тромбоцити) і гаплоїдні статеві клітини (сперматозоїди і яйцеклітини), які містять 23 хромосоми [19]. Хоча еволюціонували механізми, які гарантують, що під час поділу клітини дочірні клітини успадковують повний геном, ці механізми час від часу роблять помилки. Це може призвести до появи клітин з хромосомними аномаліями, які можна класифікувати як числові аномалії, тобто дочірня клітина містить занадто багато або занадто мало хромосом, або структурні аномалії, коли відбулися більш складні перебудови геному [20].

Нормальний хромосомний набір виду (тобто кількість, розмір і форма хромосом) називається каріотипом. Згідно з ISCN, "нормальний" каріотип

людини позначається 46,XX у жінки та 46,XY у чоловік [19]. Хромосоми людини складаються з ДНК, яка обернена навколо ядра з білків гістонів, утворюючи хроматин. Більшу частину часу хроматин існує в ядрі клітини в дифузній формі, проте під час метафазного циклу поділу клітини хромосоми конденсуються. Саме ці конденсовані хромосоми можна забарвити різними хімічними речовинами, а потім спостерігати під світловим мікроскопом, щоб виявити характерні смуги. Смуги відображають ділянки хроматину з різними характеристиками, а отже, різними функціональними елементами. Фотографічне зображення метафазних хромосом людини, розташованих за розміром, можна назвати каріограмою або каріотипом, а графічне зображення - ідеограмою [22]. Доступні барвники для хромосом відрізняються за своїми хімічними властивостями і, відповідно, за характером смугастості, яку вони утворюють. Найчастіше використовується барвник Гімза, названий на честь хіміка, який розробив його в 1904 році [21]. Мікроскопічний аналіз забарвлених хромосом називається цитогенетикою. Залежно від якості препарату хромосом, кваліфіковані цитогенетики можуть виявити аномалії з роздільною здатністю приблизно 3-4 мегабіт (мільйони пар нуклеотидів), однак аномалії нижче цього порогу роздільної здатності не можуть бути виявлені за допомогою звичайної цитогенетики і вимагають застосування альтернативних, молекулярних методів [20].

Розглядаючи конденсовані метафазні хромосоми під мікроскопом, можна виділити деякі ключові особливості. Всі хромосоми ссавців мають центромеру, яка виглядає як вузька талія, де знаходяться білки для розділення хромосом під час поділу клітини [21]. У людини центромера розташована між двома плечима хромосоми, коротше плече називається "p" (від слова "petite" - маленька), а довше - "q" (від слова "queue" - черга) [19]. Залежно від розташування центромери відносно двох плечей, хромосоми людини класифікуються як "метацентричні", де центромера знаходиться більш-менш посередині хромосоми, "субметацентричні", де центромера дещо зміщена від центру, або "ахроцентричні", де центромера значно зміщена від центру, з дуже коротким

плечем "p" [19,23]. У людини хромосоми 1, 3, 16, 19 і 20 є метацентричними, хромосоми 13, 14, 15, 21, 22 і Y - акроцентричними, а решта - субметацентричними. У еукаріот структури на кінцях кожної лінійної хромосоми називаються теломери і складаються з 300-8000 повторів послідовності TTAGGG, яка утворює петлю на кінці. Однією з функцій теломер є захист кінців хромосом від розпізнавання їх як "пошкодженої ДНК" і помилкового відновлення механізмами репарації ДНК клітини [21].

Пошкодження ДНК, наприклад, радіацією або мутагенними хімічними речовинами, може призвести до розривів хромосом. Складні контрольні точки клітинного циклу запобігають входженню в мітоз клітин з невідновленими розривами хромосом, зокрема з вільними обірваними кінцями (тобто кінцями без теломер). Існують механізми репарації ДНК, які розпізнають розриви хромосом і намагаються їх відновити [20,25]. Однак ці механізми іноді відновлюють розірвані хромосоми неправильно, що може призвести до утворення хромосом зі структурними аномаліями. Помилки під час рекомбінації, наприклад, між непарними гомологами, також можуть призвести до таких аномалій.

Якщо одна хромосома витримує розрив, неправильна репарація може призвести до втрати матеріалу (делеції), інверсії або включення в кільцеву структуру - кільцеву хромосому. Структурно аномальні хромосоми, що утворилися, можуть стабільно розмножуватися під час поділу клітини, якщо вони мають одну центромеру. Хромосоми без центромер з часом втрачаються. Хромосоми з двома центромерами зустрічаються рідко, в цих випадках одна центромера виявляється пригніченою [24].

Якщо поодинокі розриви виникають у двох різних хромосомах, неправильне з'єднання фрагментів, що утворилися, може призвести до обміну матеріалом між хромосомами (транслокації). При збалансованій реципрокній транслокації ДНК з двох різних хромосом обмінюється без чистих втрат. Якщо обидві гібридні (або "похідні") хромосоми, що утворилися, мають одну центромеру, вони будуть стабільно реплікуватися і розділятися. Однак під час утворення гамети може статися так, що лише одна з гібридних хромосом разом

з однією з незмінених хромосом буде сегрегована в гамету. Запліднення таких гамет призводить до утворення зиготи з частковою трисомією генетичного матеріалу однієї з хромосом, що брала участь у транслокації, і частковою моносомією матеріалу іншої хромосоми [21,24]. Приблизно 1 з 500 осіб є носіями збалансованої реципрокної транслокації. Такі носії часто живуть безсимптомно, однак у них спостерігається підвищена частота викиднів, пов'язана з тим, що один з батьків є носієм транслокації, а діти носіїв можуть мати вроджені аномалії розвитку [23,26].

Другий тип транслокації - це робертсонівська транслокація. У цьому випадку дві акроцентричні хромосоми розриваються біля центромер, втрачають свої короткі р-плечі і утворюють одну хромосому, яка містить одну центромеру і q-плечі обох вихідних хромосом. Носії робертсонівських транслокацій зазвичай фенотипічно нормальні, оскільки в коротких плечах усіх акроцентричних хромосом присутня лише невелика кількість генетичного матеріалу. Тому втрата двох коротких плечей може бути компенсована за рахунок решти акроцентричних хромосом [19,22]. Однак, подібно до реципрокних транслокацій, утворення гамет і подальше запліднення може призвести до утворення зигот з моносомією або трисомією однієї з акроцентричних хромосом, а отже, до народження дітей з хромосомним дисбалансом [23].

Збалансовані транслокації та інверсії не призводять до стовідсоткової втрати генетичного матеріалу. Вони впливають на фенотип носія лише в тому випадку, якщо:

- 1) розрив хромосоми порушив роботу важливого гена;
- 2) розрив впливає на експресію гена без порушення його кодуючої області [24].

1.3.1. Синдром Дауна.

Більшість пацієнтів із синдромом Дауна мають додаткову копію хромосоми 21 (рис.1.1). Трисомія 21 (каріотип 47,XX,+21 для жінок і 47,XY,+21

для чоловіків) спричинена нездатністю хромосоми 21 розділитися під час розвитку яйцеклітини або сперматозоїда. Існують різні гіпотези щодо генетичної основи синдрому Дауна та зв'язку різних генотипів з його фенотипами. Серед них - дисбаланс дозування генів, при якому спостерігається підвищена доза або кількість генів *Hsa21*, що призводить до підвищеної експансії генів [27]. Це також включає можливість асоціації різних генів з різними фенотипами синдрому Дауна. Іншою популярною гіпотезою є гіпотеза посиленої нестабільності розвитку, згідно з якою генетичний дисбаланс, створений низкою трисомних генів, призводить до більшого впливу на експресію та регуляцію багатьох генів [27].

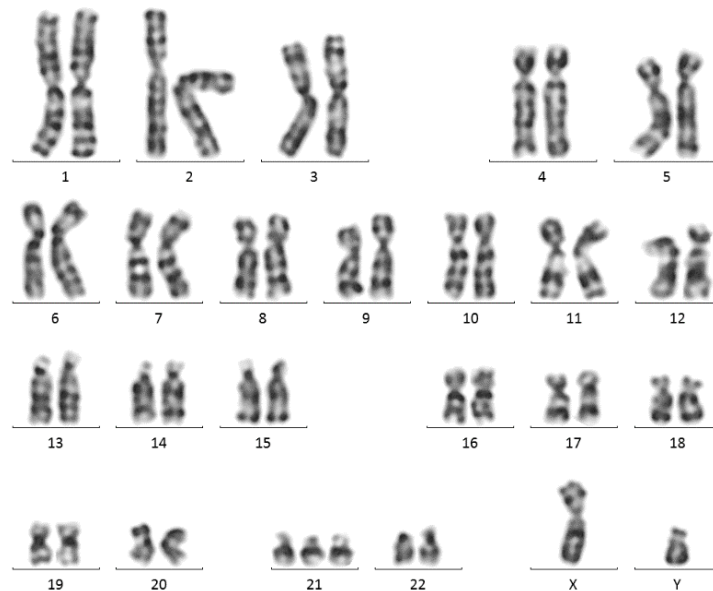


Рис. 1.1 Приклад каріотипу з додатковою 21 хромосомою.

Частота виникнення синдрому Дауна збільшується з віком матері, і вона варіює в різних популяціях (від 1 на 319 до 1 на 1000 живонароджених) [28,29], також відомо, що частота плодів з синдромом Дауна досить висока на момент зачаття, але приблизно від 50% до 75% цих плодів втрачаються до терміну. Інші аутосомні трисомії зустрічаються набагато частіше, ніж 21-а, але постнатальна виживаність при них дуже низька порівняно з синдромом Дауна. Вважається, що такий високий відсоток виживання пацієнтів з трисомією 21 залежить від

невеликої кількості генів на хромосомі 21 під назвою *Hsa21*, яка є найменшою і найменш щільною з усіх аутосом [30].

Додаткова копія хромосоми 21 асоціюється з синдромом Дауна, який виникає через нездатність хромосоми 21 розділитися під час гаметогенезу, що призводить до появи додаткової хромосоми у всіх клітинах організму. Робертсонівська транслокація та ізохромосома або кільцева хромосома є іншими двома можливими причинами трисомії 21. Ізохромосома - це стан, коли при робертсонівській транслокації розділяються два довгих плеча замість довгого і короткого плеча. Це трапляється у 2 - 4% пацієнтів. Довге плече хромосоми 21 приєднується до іншої хромосоми, переважно до хромосоми 14. При мозаїцизмі виникають 2 різні клітинні лінії через помилку поділу після запліднення [28].

З синдромом Дауна пов'язані різні клінічні стани, оскільки він вражає різні системи. Ці пацієнти мають широкий спектр ознак і симптомів, таких як інтелектуальні порушення та порушення розвитку або неврологічні особливості, вроджені вади серця, аномалії шлунково-кишкового тракту, характерні риси обличчя та аномалії [30].

Існують різні методи пренатальної діагностики синдрому Дауна. Ультразвукове дослідження між 14 і 24 тижнями гестації може бути використано як інструмент для діагностики на основі м'яких маркерів, таких як збільшена товщина носогубної складки, маленькі або відсутні кістки носа та великі шлуночки [30]. Амніоцентез і забір зразків ворсин хоріона широко використовувалися для діагностики, але існує невеликий ризик викиднів від 0,5% до 1% [31].

Також було розроблено кілька інших методів, які використовуються для швидкого виявлення трисомії 21 як під час внутрішньоутробного життя, так і після народження. Найчастіше використовується FISH інтерфазних ядер з використанням специфічних для *Hsa21* зондів або цілого *Hsa21* [31].

Існують неінвазивні методи пренатальної діагностики, які вивчаються з метою використання для пренатальної діагностики синдрому Дауна. Вони

базуються на наявності клітин плоду в крові матері та наявності безклітинної ДНК плоду в сироватці крові матері [29].

Безклітинна ДНК плода становить від 5% до 10% материнської плазми, її кількість збільшується під час вагітності і зникає після пологів. Хоча цей метод використовувався для визначення резус-статусу плода у жінок з резус-конфліктом [30], статі при зчеплених зі статтю розладах [31], а також для виявлення успадкованих по батькові аутосомних рецесивних і домінантних ознак [32], його використання для виявлення хромосомної анеуплоїдії, особливо трисомії, все ще залишається проблематичним.

Завдяки останнім досягненням у медичній практиці, розвитку хірургічних методів корекції вроджених вад та покращенню загального догляду за хворими з синдромом Дауна спостерігається значне збільшення виживання немовлят та тривалості життя пацієнтів з синдромом Дауна. Дослідження, проведене в Бірмінгемі (Велика Британія) майже 60 років тому, показало, що 45% немовлят виживають протягом першого року життя, і лише 40% залишаються живими у віці 5 років [31]. Пізніше дослідження, проведене приблизно через 50 років після цього, показало, що 78% пацієнтів із синдромом Дауна та вродженою вадю серця виживають протягом 1 року, в той час як у пацієнтів без аномалій цей показник зростає до 96% [30]. Таке збільшення тривалості життя таких пацієнтів має продовжувати суттєво зростати завдяки розвитку медицини [31].

1.3.2. Синдром Клайнфельтера.

У 1942 році Клайнфельтер та інші [32] опублікували звіт про 9 чоловіків, які мали збільшені груди, рідке волосся на обличчі та тілі, маленькі яєчка та нездатність виробляти сперму. У 1959 році у цих чоловіків із синдромом Клайнфельтера було виявлено додаткову X-хромосому (генотип XXУ) замість звичайного чоловічого статевого комплексу (генотип ХУ). Класична форма синдрому Клайнфельтера, яка зустрічається у 80-90% випадків, визначається каріотипом 47,XXУ (рис.1.2), що є результатом анеуплоїдії статевих хромосом,

тоді як анеуплоїдії вищого ступеня (наприклад, 48,XXXУ або 48,XXYY), структурно аномальна Х-хромосома (наприклад, 47,iXq,Y) або мозаїцизм (наприклад, 47,XXY/46,XY) складають приблизно 10-20% випадків, що залишилися. Поширеність синдрому Клайнфельтера (від 0,1 до 0,2% у новонароджених хлопчиків) зростає до 3-4% серед безплідних чоловіків і 10-12% у пацієнтів з азооспермією [32], і це найчастіша статеві хромосомна аномалія, що спостерігається, з оціночною частотою від 1:500 до 1:1000 чоловіків [32]. За останні роки поширеність синдрому Клайнфельтера зросла [33], хоча і без одночасного зростання поширеності анеуплоїдії за ХХУ-хромосомою. Це може вказувати на те, що зростання частоти синдрому Клайнфельтера може бути пов'язане зі збільшенням мейотичних змін у батька. Пацієнти з синдромом Клайнфельтера мають надзвичайно варіабельний фенотип, але без явної дисморфології обличчя, що робить їх не схожими на хлопчиків з нормальним каріотипом [33].

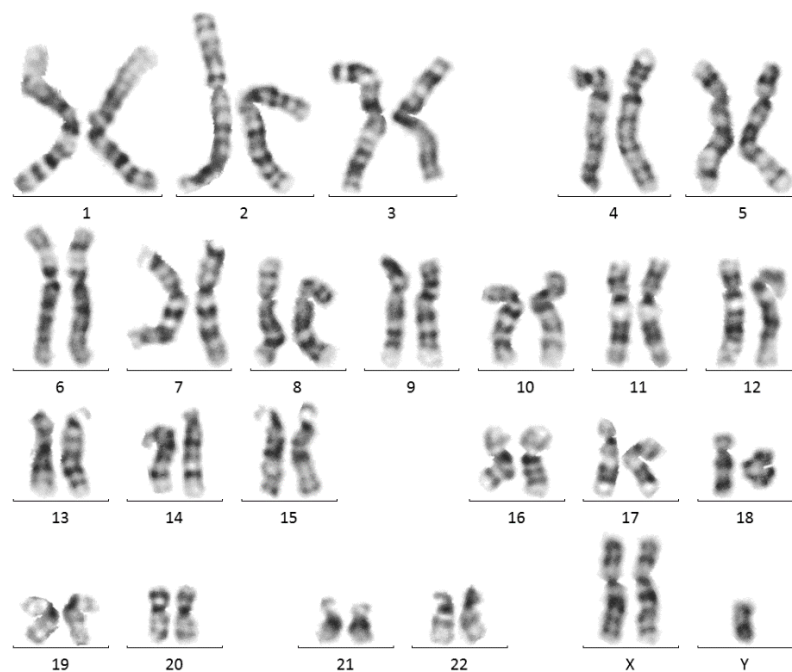


Рис.1.2 Приклад каріограми з синдромом Клайнфельтера.

Основними ознаками та симптомами синдрому Клайнфельтера були добре описані з моменту першого опису захворювання [32]. Згідно з традиційним

описом, пацієнти з синдромом Клайнфельтера мають високий зріст, маленькі яєчка, гінекомастію в пізньому пубертатному періоді, гіноїдний аспект стегон (широкі стегна), рідке волосся на тілі, ознаки дефіциту андрогенів і низький рівень тестостерону в сироватці крові в поєднанні з підвищеним рівнем гонадотропінів, азооспермію, олігоспермію з гіалінізацією і фіброзом сім'яних каналців [33, 34]. Зазвичай вищезгадані ознаки гіпогонадізму також поєднуються з психосоціальними проблемами, хоча описаний і альтернативний фенотип, що характеризується меншою кількістю клінічних ознак.

Клінічні особливості залежать як від додаткової X-хромосоми, так і від наслідків гіпогонадізму [34]. Однак більшість пацієнтів з синдромом Клайнфельтера залишаються поза увагою [33]. Поширеність синдрому Клайнфельтера є більшою, ніж кількість пацієнтів, які дійсно отримали клінічний діагноз, завдяки порівнянню епідеміологічних даних, отриманих в результаті пренатальної діагностики, з даними, отриманими від чоловіків, яким діагноз був поставлений після народження [32, 33].

Генетичною основою синдрому Клайнфельтера є нерозходження статевих хромосом, що призводить до наявності додаткової X-хромосоми або хромосом. Нерозходження являє собою нездатність хромосоми поділитися в анафазі під час мейозу I, мейозу II або мітозу, що призводить до утворення клітин з аберантним числом хромосом. Це може статися під час оогенезу або сперматогенезу (аберантний поділ хромосом або хроматид під час материнського або батьківського мейозу відповідно) або, рідше (близько 3%), під час раннього поділу заплідненої яйцеклітини.

Виникнення материнського або батьківського мейотичного нерозходження виявляється однаково розподіленим у пацієнтів з синдромом Клайнфельтера (майже по 50%) [34]. У пацієнтів з додатковою материнською X-хромосомою найімовірніше відбулося нерозходження в першому або другому мейотичному поділі, в той час як у батьківських випадках додаткова X-хромосома може походити тільки від нерозходження в першому мейотичному

поділі, оскільки помилка мейозу II призведе до утворення або XX, або YY гамет і, відповідно, XXX або XYY зигот [34].

Мозаїцизм (переважно 46,XY/47,XXY) зустрічається приблизно у 10-20 % пацієнтів з синдромом Клайнфельтера і виникає або через нерозходження в ранньому мітотичному поділі зиготи 46,XY, що розвивається, або через втрату однієї з X-хромосом при зачатті 47,XXY внаслідок відставання в анафазі.

1.3.3. Синдром Патау.

Причиною синдрому Патау є наявність трьох копій хромосоми 13 (рис.1.3), найчастіше це пов'язано з нерозходженням у мейозі, що частіше трапляється у матерів старшого віку (старше 35 років) [35]. Іншою причиною є незбалансована робертсонівська транслокація, в результаті якої утворюються дві нормальні копії хромосоми 13 і додаткове довге плече хромосоми 13 [35]. Ще однією менш поширеною причиною є мозаїцизм, при якому в одних клітинах утворюється 3 копії хромосоми 13, а в інших - дві копії. Мозаїцизм є наслідком помилки нерозходження мітозу і не пов'язаний з віком матері [36]. Прогноз кращий у пацієнтів з мозаїцизмом і пацієнтів з незбалансованими транслокаціями [36].

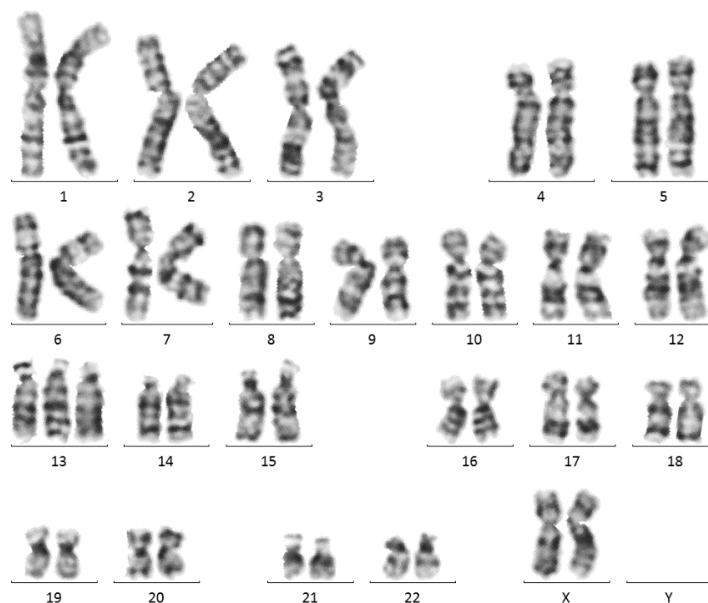


Рис.1.3 Приклад кариотипу з додатковою хромосомою 13.

Цитогенетичні аномалії присутні у 50% випадків загибелі плода до 20 тижнів гестації та у 6%-13% випадків мертвонародження. Загалом, смерть плода відбувається у 15% вагітностей, які розпізнаються клінічно. Трисомія 13 є однією з найпоширеніших трисом і зустрічається в 1 на 5000 пологів [35].

Додаткова копія хромосоми 13 викликає дефекти при синдромі Патау. Літній вік матері є фактором ризику цієї патології через підвищену частоту нерозходження в мейозі [35]. Ця додаткова копія хромосоми 13 порушує нормальний ембріональний розвиток і призводить до множинних дефектів.

Немовлята з синдромом Патау зазвичай мають затримку внутрішньоутробного розвитку та мікроцефалію. Дефекти обличчя переважно стосуються середньої лінії і включають циклопію, розщілину губи та піднебіння. Риси обличчя включають скошене чоло, маленькі вуха, анофтальмію або мікрофтальмію, мікрогнатію та преаурикулярні мітки. Аномалії центральної нервової системи також, як правило, є серединними, причому найпоширенішим дефектом є алобарна голопрозенцефалія. Поширені вади кінцівок включають постаксіальну полідактилію, вроджену еквіноварусну стопу або стопу-качалку [35, 36].

Спектр серцевих захворювань при синдромі Патау включає дефект міжшлуночкової перегородки, дефект міжпередсердної перегородки, тетраду Фалло, дефект атріовентрикулярної перегородки та подвійний вихід правого шлуночка. Серцеві вади зазвичай не призводять до летального результату в дитячому віці, навіть якщо їх не лікувати [35].

Інші системи органів, на які впливають аномалії, включають легені, печінку, нирки, сечостатеві шляхи, травний тракт і підшлункову залозу [36]. Дефекти цих систем органів, які зустрічаються у понад 50% пацієнтів з синдромом Патау, включають крипторхізм, гіпоспадію, гіпоплазію малих статевих губ і дворогу матку. Аномалії цих систем органів, що зустрічаються менш ніж у 50% пацієнтів із синдромом Патау, включають омфалоцеле,

неповний поворот товстої кишки, дивертикул Меккеля, полікістоз нирок, гідронефроз і підковоподібну нирку [35].

Пацієнти, які пережили дитинство, мають важкі психомоторні розлади, відставання у розвитку, інтелектуальну недостатність та судоми [37].

Діагноз синдрому Патау можна поставити пренатально за допомогою взяття зразків ворсин хоріона, амніоцентезу або аналізу вільної ДНК плода [35]. Ці методи дослідження дозволяють виявити трисомію 13. Пренатальне УЗД також може допомогти виявити вади розвитку при синдромі Патау, такі як голопрозенцефалія або інші аномалії центральної нервової системи, аномалії обличчя, скелетні аномалії, ниркові або серцеві вади, а також затримку росту, які зазвичай присутні [37, 35]. Пренатальне УЗД після 17 тижнів вагітності є найбільш чутливим у виявленні аномалій розвитку при синдромі Патау [37]. Аномальні результати повинні бути підтвержені цитогенетичним дослідженням клітин плода.

Тканинний мікрочип підвищив здатність діагностувати генетичні зміни при внутрішньоутробній загибелі плода, особливо коли плід мацерований [36].

Кілька великих досліджень детально описали загальний несприятливий прогноз для пацієнтів із синдромом Патау. Історично середня виживаність становить від 7 до 10 днів у живонароджених пацієнтів, і 90% не доживають до 1 року [35, 36]. Нещодавно з'явилися повідомлення про випадки більш тривалого виживання при застосуванні агресивних медичних втручань [36]. Прогноз кращий у пацієнтів з мозаїчним синдромом Патау і пацієнтів з незбалансованими транслокаціями [37]. Агресивне лікування за допомогою хірургічних і медикаментозних втручань може збільшити середню виживаність до 733 днів, як показало нещодавнє дослідження [36].

Дев'яносто відсотків пацієнтів із синдромом Патау не доживають до одного року після народження, а багато хто помирає внутрішньоутробно [35]. Якщо пацієнт пережив дитинство, може виникнути багато інших ускладнень, пов'язаних із загальними вродженими аномаліями [36].

1.3.4. Синдром Шерешевського-Тернера.

Синдром Тернера, також відомий як синдром вродженої гіпоплазії яєчників, був вперше описаний Анрі Тернером, лікарем з Оклахоми, у 1938 р. [38]. Це найпоширеніша аномалія статевих хромосом, що зустрічається у жінок. Вона виникає, коли одна з X-хромосом відсутня, частково або повністю.

Синдром Тернера виникає внаслідок делеції або нефункціонування однієї X-хромосоми у жінок. Близько половини населення з синдромом Тернера мають моносомію X (45,X, рис.1.4). Інші 50% населення мають мозаїчний хромосомний компонент (45,X з мозаїчністю).

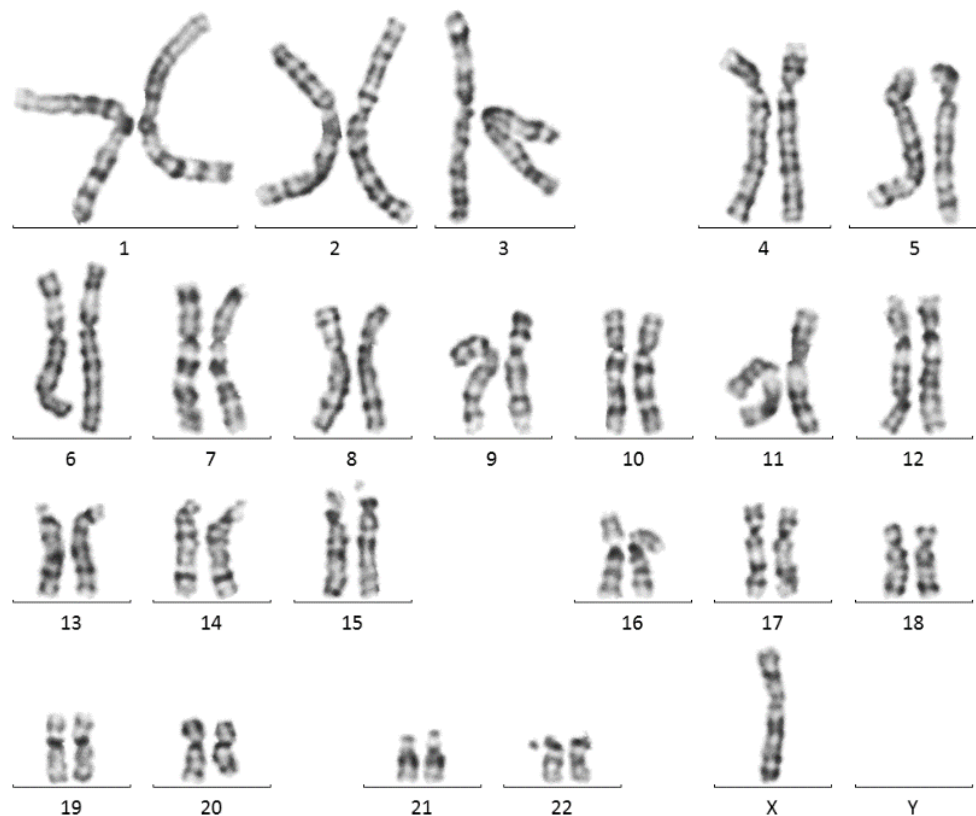


Рис.1.4 Приклад кариотипу з синдромом Шерешевського-Тернера.

Деякі типи аномалій X-хромосоми, які можуть призвести до нефункціонуючої X-хромосоми, наведені нижче [39]:

1. Ізохромосома Xq, де є дві копії довгого плеча хромосоми, які з'єднані головою до голови.
2. Кільцева хромосома, в якій відсутня частина кінців короткого та довгого плечей X-хромосоми.
3. Xp або Xq делеція, при якій відбувається видалення частини короткого плеча X-хромосоми.

У деяких пацієнтів із синдромом Тернера може бути мозаїчність Y-хромосоми. Хоча *SHOX* (ген, що містить гомеобокс на X-хромосомі, який відповідає за низький зріст) не є причиною синдрому Тернера, він асоціюється з низьким зростом, який спостерігається при синдромі Тернера. Синдром Тернера зазвичай не успадковується, а є випадковою подією під час репродукції.

Синдром Тернера зустрічається приблизно в 1:2000 – 1:2500 живонароджених жінок [39]. Однак справжня поширеність залишається невідомою, оскільки багато пацієнтів з м'яким фенотипом можуть залишатися недіагностованими або діагноз їм ставлять у дорослому віці [40]. Частота виникнення синдрому Тернера майже однакова в різних етнічних групах і країнах. З підвищенням обізнаності про пренатальне ультразвукове сканування, поширеність синдрому Тернера при народженні зменшується; це відбувається тому, що деякі матері, які виношують плоди з синдромом Тернера, вирішують перервати вагітність.

У більшості випадків синдром Тернера не успадковується. Коли причиною є моносомія X, хромосомна аномалія є випадковою подією під час формування репродуктивних клітин у батьків людини. Помилка в поділі клітин називається нерозходженням і може призвести до утворення репродуктивних клітин з аномальною кількістю хромосом. Наприклад, статеві хромосоми можуть бути втрачені з яйцеклітини або сперматозоїда через нерозходження. Якщо атипична репродуктивна клітина робить внесок у генетичний склад дитини, кожна клітина матиме одну X-хромосому, а інша статеві хромосома буде відсутня.

Синдром мозаїки Тернера також не є спадковим захворюванням. Він виникає внаслідок випадкової події під час поділу клітин на стадії раннього

внутрішньоутробного розвитку ураженої людини. В результаті деякі клітини людини мають звичайні дві статеві хромосоми, тоді як інші клітини містять лише одну копію X-хромосоми. У жінок з мозаїчністю X-хромосоми можливі й інші аномалії статевих хромосом. Рідко синдром Тернера може бути наслідком часткового видалення X-хромосоми, що може передаватися з покоління в покоління.

Синдром Тернера може бути ідентифікований пренатально за допомогою аномальних ультразвукових даних, таких як підвищена прозорість носової порожнини, кістозна гідрома носової порожнини, коарктація аорти/лівобічні серцеві аномалії, брахіцефалія, підковоподібна нирка, багатоводдя, олігогідрамніон або неімунна водянка плода. У новонароджених дівчаток синдром Тернера може проявлятися вродженою лімфедемою кистей і стоп, ребристою шиєю, дисплазією нігтів, вузьким і високо піднесеним піднебінням, а також короткими четвертими п'ястковими або плесновими кістками. У міру дорослішання у дівчаток розвивається низький зріст, "щитоподібні" груди з широко розставленими сосками, решітчаста шия, низька лінія росту волосся біля основи шиї, вальгусна клишоногість, деформація передпліччя та зап'ястя за Маделунгом [41].

Пацієнти з синдромом Тернера зазвичай мають нормальний інтелект, але можуть мати специфічні нейрокогнітивні дефіцити, наприклад, проблеми з візуально-просторовою організацією. Така ситуація може призвести до підвищеного ризику порушень у навчанні, особливо пов'язаних з обчисленнями, пам'яттю та увагою. У підлітковому віці у дівчат часто спостерігається затримка статевого дозрівання або первинна аменорея, що є наслідком передчасної оваріальної недостатності. Характерною ознакою синдрому Тернера є "смугасті статеві залози". Це яєчники, які в основному складаються зі сполучної тканини і не мають фолікулів або мають лише кілька атретичних фолікулів.

Пацієнтки з синдромом Тернера також мають підвищений ризик серцево-судинних вад розвитку, що, в свою чергу, призводить до підвищеного ризику смертності у цих осіб. Деякі з серцевих вад - це аномалії аортального клапана

(насамперед двостулковий аортальний клапан), подовжена поперечна дуга аорти, легеневі венозні аномалії. Розшарування аорти ще більше підвищує ризик смерті у цих пацієнтів. Втрата слуху є поширеним явищем через рецидивуючий середній отит, що спричиняє кондуктивну приглухуватість, або через дефект зовнішніх волоскових клітин равлика, що спричиняє сенсоневральну приглухуватість [41]. Ниркові аномалії часто зустрічаються при синдромі Тернера і включають вади розвитку збиральної системи, позиційні аномалії та підковоподібні нирки.

Очні аномалії можуть бути присутніми при синдромі Тернера, такі як короткозорість або далекозорість, косоокість, амбліопія, епікантові складки, птоз, гіпертелоризм і червоно-зелена колірна сліпота [42]. Синдром Тернера підвищує ризик аутоімунних розладів, включаючи гіпотиреоз, целиакію та запальні захворювання кишечника [43]. Через наявність дисгенічних гонад жінки з синдромом Тернера мають підвищений ризик розвитку гонадобластоми.

Синдром Тернера можна діагностувати пренатально за допомогою біопсії ворсин хоріону або амніоцентезу. Синдром Тернера слід запідозрити, коли пренатальне УЗД показує водянку плода, кістозну гігрому або серцеві вади. Діагноз потребує підтвердження після народження за допомогою аналізу каріотипу. Іноді каріотип може бути нормальним, якщо це мозаїцизм, і якщо є сильна підозра, на додаток до каріотипу можна провести FISH-дослідження. Генетичне дослідження з аналізом каріотипу необхідне для підтвердження діагнозу в осіб з характерними клінічними ознаками, описаними вище. Першим кроком є аналіз каріотипу за допомогою мононуклеарних клітин периферичної крові.

У підлітковому віці пацієнти можуть мати або затримку статевого дозрівання, або аменорею. Підвищений рівень фолікулостимулюючого гормону вказує на синдром Тернера, а антимюллерів гормон може бути більш чутливим маркером для прогнозування оваріальної недостатності [44]. Якщо початковий каріотип нормальний у пацієнта з клінічною підозрою на синдром Тернера, слід провести повторне дослідження каріотипу, використовуючи іншу тканину, таку

як шкіра, клітини слизової оболонки щік або епітеліальні клітини сечового міхура.

Після встановлення діагнозу синдрому Тернера, лікування включає оцінку інших супутніх патологій, таких як серцеві аномалії, ниркові аномалії та порушення здатності до навчання. Скринінг повинен бути частиною базового обстеження, і в подальшому пацієнти повинні проходити періодичні обстеження. При первинному діагнозі пацієнтам слід провести ультразвукове дослідження нирок та оцінку серцево-судинної системи, включаючи ехокардіографію у немовлят і дітей та МРТ у дівчат і жінок старшого віку [43, 44, 45].

Пацієнти з синдромом Тернера мають підвищений рівень смертності, втричі вищий, ніж у загальній популяції. Серцево-судинні захворювання через ішемічну хворобу серця та інсульт у пацієнтів старшого віку є важливим фактором. Серед вроджених серцево-судинних захворювань аневризми аорти є найбільшою причиною. Пацієнти також демонструють збільшення смертності від пневмонії, діабету, епілепсії, захворювань печінки та нирок [45].

Деякі поширені ускладнення пов'язані з синдромом Тернера є наступними:

1. Втрата слуху.
2. Гіпотиреоз.
3. Порушення функції печінки.
4. Нейрокогнітивний дефіцит, що може потребувати спеціальних послуг у школі.
5. Підвищений ризик аутоімунних захворювань.
6. Розшарування аорти.
7. У жінок з Y-хромосою підвищується ризик розвитку гонадобластоми.
8. Метаболічні порушення - центральне ожиріння, інсулінорезистентність, цукровий діабет 2 типу, дисліпідемія.

1.3.5. Синдром Едвардса.

Синдром Едвардса, який також називають синдромом трисомії 18, - це аутосомно-хромосомне захворювання, зумовлене додатковою копією хромосоми 18 (рис.1.5). Синдром Едвардса є одним із синдромів аутосомної трисомії, який за частотою зустрічається лише після трисомії 21. Вперше про синдром Едвардса повідомили Едвардс та інші у 1960 році, коли описали новонародженого з множинними вродженими вадами розвитку та когнітивним дефіцитом [46]. Сміт та інші підтвердили, що додаткова копія хромосоми 18 є основною причиною синдрому Едвардса [47].

Синдром Едвардса зазвичай виникає внаслідок наявності додаткової копії хромосоми 18q. Існує три типи синдрому Едвардса: повна, часткова та мозаїчна трисомія 18.

Повна трисомія 18 - найпоширеніша форма (94%). При цьому типі кожна клітина містить три повні копії хромосоми 18. Додаткова хромосома з'являється внаслідок нерозходження, переважно під час мейозу II. Додаткова хромосома найчастіше має материнське походження. Частота помилок нерозходження збільшується з віком матері [46].

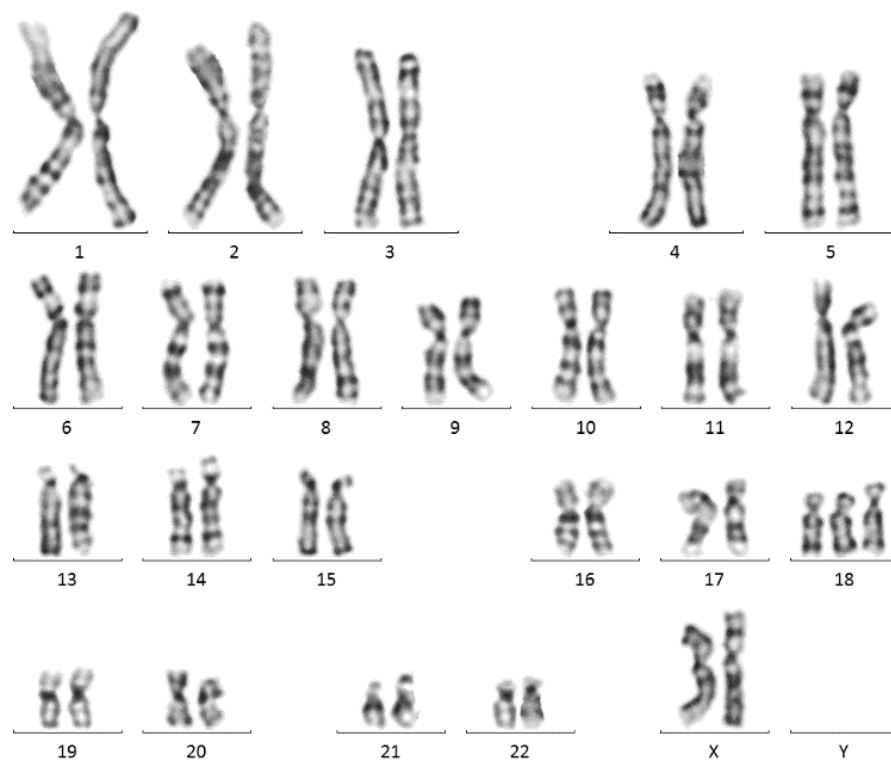


Рис.1.5 Приклад кариотипу з додатковою 18 хромосомою.

Мозаїчна трисомія 18 - другий за поширеністю тип (менше 5%). У цьому типі існує як повна трисомія 18, так і нормальна клітинна лінія. Таким чином, фенотип може варіювати від фенотипу повної трисомії 18 з ранньою смертністю до нормального фенотипу.

На часткову трисомію 18 припадає 2% випадків синдрому Едвардса. У цьому типі лише частковий сегмент хромосоми 18q присутній у потрійному варіанті. Частковий потрійний варіант часто є результатом збалансованої транслокації або інверсії, яку переносить один з батьків. Часткова трисомія 18 має варіабельний фенотип, який залежить від локалізації та протяжності потрійного сегмента.

Поширеність синдрому Едвардса має позитивну кореляцію з віком матері. Ризик рецидиву при повній трисомії 18 становить від 0,5% до 1% при наступних вагітностях [47]. Якщо один з батьків є носієм збалансованої транслокації, що призводить до незбалансованої транслокації у дитини, як при частковій трисомії 18, ризик рецидиву може бути вищим до 20% при наступній вагітності.

Поширеність синдрому Едвардса серед живонароджених коливається від 1:3600 до 1:10 000. За останні два десятиліття поширеність трисомії 18 зросла через збільшення середнього віку матерів. Поширеність синдрому Едвардса варіюється в залежності від країни та політики переривання вагітності. У США загальна поширеність синдрому Едвардса становить приблизно 1:2500, а поширеність серед живонароджених – 1:8600 [47, 46]. Поширеність вища серед жінок порівняно з чоловіками (3:2). Однак, втрати плоду вищі у чоловіків, ніж у жінок, і жінки мають кращі показники виживання, ніж чоловіки.

Фенотип синдрому Едвардса пов'язаний з трьома копіями двох критичних ділянок у довгому плечі хромосоми 18, 18q12.1 - 18q21.2 та 18q22.3 - 18qter [47]. Тяжка розумова відсталість при синдромі Едвардса може бути пов'язана з трисомією 18q12.1 - 18q21.2. Трисомія короткого плеча хромосоми 18 (18p), схоже, не викликає жодної з основних ознак синдрому Едвардса.

Синдром Едвардса характеризується варіабельними клінічними проявами з мультисистемним ураженням. На сьогоднішній день зареєстровано понад 125

аномалій, які є ознаками синдрому Едвардса. Однак жодна з клінічних ознак не є патогномонічною для синдрому Едвардса.

Більшість випадків синдрому Едвардса діагностується пренатально, на основі антенатального скринінгу з урахуванням віку матері, сироваткового маркера матері або за результатами ультразвукового дослідження під час другого триместру. Антенатально при синдромі Едвардса можна виявити затримку внутрішньоутробного розвитку, багатоводдя, агенезію мозолистого тіла, кісту хоріоїдального сплетення, потовщення потилиці, брахіцефалію, стиснуті руки з переважанням вказівних пальців, вади серця, омфалоцеле та єдину пупкову артерію [48]. Синдром Едвардса має високий ризик втрати плоду та мертвонародження.

Обстеження та діагностика трисомії 18 починаються в антенатальному періоді. Скринінг сироватки крові матері може показати низький рівень альфа-фетопротеїну, хоріонічного гонадотропіну людини та некон'югованого естріолу [49]. Сироваткові та генетичні маркери є більш корисними у поєднанні з класичними результатами ультразвукового дослідження, такими як підвищена прозорість пуповини матки. Наприклад, неінвазивне пренатальне тестування з використанням безклітинної ДНК плода в материнській плазмі відіграє певну роль у діагностиці трисомії 18, але саме по собі має лише 60,7% достовірності результату [46]. Амніоцентез або забір зразків ворсин хоріона рекомендується, якщо антенатальний скринінг вказує на високий ризик анеуплоїдії плода [48].

Після пологів оцінку проводять на основі фенотипових змін та клінічної картини. Діагностичні візуалізаційні дослідження, такі як ультразвукове дослідження, можуть бути використані для оцінки внутрішньочерепних, серцевих (ехокардіограма), внутрішньочеревних та ниркових аномалій [48]. Скринінг є доцільним для таких пацієнтів, оскільки аномалії можуть бути виявлені у багатьох системах органів.

Каріотипування та мікрочиповий аналіз можуть підтвердити трисомію та отримати більш детальну інформацію про мозаїцизм відповідно.

Майже 40% плодів помирають під час пологів, а третина плодів, що вижили, народжуються передчасно. Медіана виживання при синдромі Едвардса становить від 3 днів до 14,5 днів. Відсоток виживання становить від 60% до 75% протягом першого тижня, від 20% до 40% протягом одного місяця і 10% протягом одного року. Від 5% до 10% пацієнтів із синдромом Едвардса виживають після першого року життя [49].

Немовлята жіночої статі з синдромом Едвардса мають більші шанси на виживання, ніж немовлята чоловічої статі. Нечисленні випадки синдрому Едвардса мозаїчного типу мають більш тривале виживання порівняно з класичним типом. Найважливішими причинами смертності є серцева недостатність через серцеві вади, дихальна недостатність через обструктивне ускладнене дихання, легенева гіпертензія, гіповентиляція та центральне ускладнення дихання.

1.3.6. Триплоїдія.

Вважається третьою за поширеністю фатальною хромосомною аномалією [50]. Вона виникає у 1-2% випадків зачаття, але переважна більшість з них призводить до спонтанних абортів на ранніх термінах внутрішньоутробного розвитку.

Виникнення триплоїдії вважається спорадичним. Плід з триплоїдією має 69 хромосом (рис.1.6). Це може статися трьома способами:

- 1) збій поділу мейозу I або II в сперматоциті: додатковий набір батьківських хромосом;
- 2) збій поділу мейозу I або II в яйцеклітині: додатковий набір материнських хромосом;
- 3) диспермія: подвійне запліднення яйцеклітини двома сперматозоїдами [50].



Рис.1.6 Приклад каріотипу з триплоїдією.

У ~60-75% випадків додатковий набір походить від батька (діандрична триплоїдія). Відомо про такі хромосомні склади [51]:

1. 69XXY: ~60%;
2. 69XXX: ~37%;
3. 69XYX: ~3%.

У деяких випадках може спостерігатися диплоїдний/триплоїдний мозаїцизм [51].

Ехографічні ознаки вагітностей, ускладнених триплоїдією плода, не є однорідними, і діагноз не може бути поставлений лише за допомогою ультразвукового дослідження, проте загальні ознаки включають:

- 1) затримка внутрішньоутробного розвитку плода, що починається у другому триместрі (рання), зі зниженим потенціалом росту та антропометричними показниками:
 - 69 XXX: має тенденцію до ранньої асиметричної затримки внутрішньоутробного розвитку плода;
 - 69 XXY: має тенденцію до симетричних затримок внутрішньоутробного розвитку плода [51].

2) асиметрія тіла з відносною макроцефалією та піднесеною головою: співвідношення окружності живота:

- гідроцефалія плода;
- багатоводдя;

3) плацентарні зміни:

- аномально велика плацента (плацентомегалія) та/або водянка плаценти: у випадках батьківського походження;
- маленька плацента: у випадках материнського походження.

4) синдактилія: має тенденцію до ураження 3-го та 4-го пальців рук [51].

Триплоїдія несумісна з життям і у більшості випадків призводить до викидня у першому триместрі. Відомо про вкрай рідкісні випадки виживання протягом декількох місяців після народження. Оскільки більшість випадків є спорадичними, ризик рецидиву, як правило, не підвищений [50].

Висновки. Огляд сучасної літератури з питань виникнення і поширеності хромосомної патології, впливу різного типу мутацій на генотип людини показав, що хромосомні порушення роблять суттєвий внесок у структуру причин репродуктивних розладів людини. Незважаючи на методи вторинної профілактики, частота таких захворювань залишається високою, що вказує на актуальність продовження досліджень з удосконалення діагностики і профілактики такої патології.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Всі експериментальні дослідження даної магістерської роботи виконані на базі цитогенетичної лабораторії Медико-біологічного центру «Геном» (м. Київ).

2.1. Схема експерименту та об'єкт дослідження

Цитогенетичні досліджування проводилися на матеріалах, отриманих після проведення інвазивної діагностики: амніоцентезу (культура амніотичної рідини), біопсії ворсин хоріону (біоптату ворсин хоріону), плацентоцентезу (клітини ворсин плаценти), а також на клітинах ворсин хоріона мимовільно втрачених вагітностей.

Взяття амніотичної рідини, ворсин хоріону та плаценти проводилось трансабдомінальним доступом методом «вільної» руки під контролем ультразвукового дослідження. Оптимальний термін взяття зразка амніотичної рідини 16-21 тиждень. Рекомендований об'єм вод для пункції становить 20-30 мл. Така кількість аспірованої рідини не впливає на загальний обсяг амніотичних вод і є достатньою для проведення необхідних генетичних досліджень. Після пункції оцінювали фізичні властивості амніотичної рідини (колір, прозорість). Амніотичну рідину транспортували до цитогенетичної лабораторії ПП «Медико-біологічного центру «Геном» для досліджень у стерильних пробірках або культуральних флаконах, без охолоджуючих блоків при кімнатній температурі. Допускається зберігання зразка протягом доби при кімнатній температурі у темному контейнері.

Забір абортівного матеріалу здійснювався лікарем у медичному закладі, після чого доставлявся у відмитому посуді від дезинфікуючого розчину. При терміні вагітності 5-10 тижнів збирався весь зішкряб із порожнини матки, що містить плідне яйце або хоріон. При терміні 11 тижнів і більше доставлялася

плацента, поміщена в ємність зі стерильним фізіологічним розчином та гепарином (0,5 мл гепарину на 100 мл фізіологічного розчину). Використання формаліну не допускається, такий матеріал не приймали до подальшої обробки.

Усі дані про різні види отриманих біологічних матеріалів заносили до журналу реєстрації прийому біологічного матеріалу.

Амніотичну рідину аналізували непрямим методом (методом довгострокового культивування): виконували посадку, далі клітини культивували, виконували заміну середовища, фіксували, виготовляли препарати метафазних хромосом, виконували забарвлення GTG-методом та проводили аналіз отриманих препаратів. Матеріал отриманий пренатально (ворсини хоріона та плаценти) та абортівний матеріал аналізували прямим методом: очищували ворсини хоріона або плаценти від зайвого матеріалу, піддавали гіпотонічній обробці та фіксували одразу безпосередньо після отримання, виготовляли препарати метафазних хромосом, виконували фарбування препаратів GTG-методом та проводили аналіз отриманих препаратів. Досліджували частоти та спектри аномалій каріотипу жінок у біологічному матеріалі під час пренатальної інвазивної діагностики та у клітинах ворсин хоріону ембріона після мимовільно втрачених вагітностей методами цитогенетичного аналізу, а також аналізували корелятивні зв'язки між ймовірністю дослідження аномального каріотипу та виду досліджуваного біологічного матеріалу.

2.2. Витратні матеріали, реактиви та обладнання, необхідні для дослідження

При проведенні досліджень використовували такі витратні матеріали:

- ємність для дезінфекції багаторазового посуду;
- дезінфікуючий розчин;
- бинт;
- предметні скельця;

- стерильні та нестерильні пастерівські піпетки;
- стерильні слайд-флакони для культивування T-25 із синьою кришкою без фільтра (Nunc, Данія);
- пробірки конічні центрифужні з кришками;
- нестерильні рукавички без тальку;
- стерильні рукавички;
- дистильовану воду;
- знежирюваний мийний засіб для обробки предметних скелець;
- накінечники для автоматичного дозатора;
- стерильний скребок для клітинних культур в індивідуальній упаковці;
- чашки Петрі.

Реактиви:

- Поживне середовище для культивування амніоцитів AmnioMAX™-II Complete Medium (Gibco, США)
- Колхіцин чи колцемід (порошок)
- 0,25% розчин трипсину/EDTA (Gibco, США);
- Хлорид калію (порошок)
- Етанол або метанол
- Крижана оцтова кислота
- Фарба Гімза (Sigma, США);
- Фосфатний буфер (таблетка)
- Дистильована вода
- KCl 0,075M;
- цитрат натрію 1%.

Обладнання:

- ламінарний бокс (Biosan, Латвія);
- термостат сухоповітряний (Micromed, Китай);
- ваги електронні (Дніпровіс, Україна);
- центрифуга (Biosan, Латвія);

- витяжна шафа (Biosan, Латвія);
- холодильник (Samsung, Південна Корея);
- вортекс (Biosan, Латвія);
- дозатор для серологічних піпеток (Eppendorf, США);
- спиртова горілка;
- дозатор автоматичний (Eppendorf, США);
- стереомікроскоп (Nikon, Японія);
- мікроскоп для каріотипування з камерою та автоматичною програмою для обробки зображень (Carl Zeiss, Німеччина).

Лабораторний посуд:

- бобовидний судок;
- штатив для центрифужних пробірок;
- стерильні пінцети;
- скляні банки з кришками;
- скляні мірні стакани;
- мірні циліндри;
- склянки для розчинів;
- серологічні піпетки (5 мл).

2.3. Підготовка розчинів

По ходу дослідження готували наступні розчини:

1. Розчин 0,075 М КСІ: розчиняємо 2,220 г КСІ у 500 мл нагрітої до температури $+37^{\circ}\text{C}$ дистильованої води. Приготування розчину виконують в день проведення дослідження та може зберігатися протягом тижня, перед застосуванням має бути нагрітим до $+37^{\circ}\text{C}$.
2. Розчин цитрату натрію 1,0%: розчиняємо 900 мг цитрату натрію у 100 мл нагрітої до температури $+37^{\circ}\text{C}$ дистильованої води. Готують перед проведенням дослідження, дозволяється зберігання даного розчину у

холодильнику тиждень, перед застосуванням має бути нагрітим до +37°C.

3. Фіксуєча суміш: змішуємо крижану оцтову кислоту із метиловим спиртом у співвідношенні 1:3. Розчин готують перед фіксацією під витяжною шафою та зберігається у холодильнику при температурі +4°C.
4. 0,01%-ий розчин колхіцину: 0,01 г колхіцину розчиняємо у 100 мл дистильованої води. Зберігаємо при температурі +4°C.
5. 60%-ий розчин оцтової кислоти: до 15 мл 99% оцтової кислоти додаємо 9 мл дистильованої води. Готуємо під витяжною шафою перед використанням.
6. Робочий розчин барвника Гімза: до 10 мл фосфатного буфера (pH 6,8) додаємо 1 мл барвника Гімза для хромосомних препаратів із амніоцитів та до 12 мл фосфатного буфера (pH 6,8) додаємо 2 мл барвника Гімза для препаратів із ворсин хоріона та плаценти. Розчин можна використовувати протягом одного робочого дня.

2.4. Методи дослідження

2.4.1. Метод культивування клітин амніотичної рідини для цитогенетичного аналізу хромосомного набору плоду без CO₂ інкубатора (непрямий метод).

2.4.1.1. Посадка та культивування клітин амніоцити. Усі дослідження проводились із січня 2022 по вересень 2023 років у цитогенетичній лабораторії ПП «Медико-біологічний центр «Геном». Культивування амніотичної рідини проводиться у стерильних умовах (ламінарний бокс). Посадка культури здійснюється у культуральні слайд-флакони (по 2 флакони на пацієнта). У кожен флакон наливаємо 10-12 мл амніотичної рідини та додаємо по 4 мл амніомаксу у кожен флакон. Поміщаємо для культивування у термостат при 37°C.

Через 4-5 днів культивування відбувається проміжна заміна середовища. У стерильних умовах (в ламінарному боксі) зливаємо із флаконів усю рідину, додаємо по 4 мл свіжого амніомаксу та продовжуємо культивувати у термостаті ще 5 днів, перевіряючи ріст культури під стереомікроскопом через 3 дні.

На 4 день культивування після проміжної заміни відбувається остання заміна середовища перед фіксацією на 1 мл.

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

2.4.1.2. Фіксація клітиної культури амніоцитів. Фіксація складається із 15 етапів, а саме:

1. Через 16 год після заміни середовища на 1 мл капаємо по 1 краплі колхіцину (зі шприця) та лишаємо на 2 год в термостаті;
2. Зливаємо середовище та додаємо по 1 мл теплої трипсину у кожен флакон та змішуємо із залишками середовища;
3. Не зливаючи трипсин додаємо по 8 мл гіпотонічного розчину (КСІ), змішуємо та лишаємо в термостаті на 8 хв.;
4. Додаємо 2 мл фіксуючого розчину (у співвідношенні 1:3 крижаної оцтової кислоти та 96% спирту), змішуємо та лишаємо під витяжкою на 3 хв.;
5. Додаємо ще 3 мл фіксуючого розчину, змішуємо та лишаємо на 4 хв під витяжною шафою;
6. Підготовлюємо пробірку та шкрябок для кожного флакону;
7. Відшкрябуємо усі колонії з флакону та всю рідину переливаємо у пробірку (загальний об'єм має бути 14 мл);
8. Центрифугуємо 4 хв. при 2000 обертів.
9. Поки центрифугується додаємо у флакон 3 мл фіксуючого розчину, змішуємо та залишаємо під витяжкою;
10. Відбираємо супернатант лишаючи у пробірці 1,5 мл рідини, збиваємо осад на вортексі та заливаємо з флакону фіксуючий розчин із залишками клітин;

11. Додаємо ще 3 мл фіксуючого розчину у флакон, відмиваємо усі залишки клітин та зливаємо в пробірку (загальний об'єм 7,5 мл), лишаємо в холодильнику на 20 хв.;
12. Центрифугуємо 4 хв. при 2000 обертів;
13. Відбираємо супернатант лишаючи у пробірці 1,5 мл рідини, збиваємо осад на вортексі, додаємо 5 мл фіксуючого розчину та лишаємо в холодильнику на 1 год.;
14. Центрифугуємо 4 хв. при 2000 обертів;
15. Відбираємо супернатант лишаючи у пробірці 1,5 мл рідини, збиваємо осад на вортексі, додаємо 8 мл фіксуючого розчину та лишаємо в холодильнику на ніч.

2.4.1.3. Виготовлення препаратів. Для приготування хромосомних препаратів зафіксовану суспензію центрифугуємо 4 хв. при 2000 обертів. Відбираємо супернатант лишаючи у пробірці 1 мл рідини та розкапуємо на охолоджені, мокрі скельця під нахилом. Препарати підсушуються при кімнатній температурі та переносяться на термостіл, де повністю просушуються при температурі 90°C протягом 1 години. Після сушки переносимо скельця у термостат підігрітий до 37°C на 1-2 години.

2.4.2. Прямий метод дослідження ворсин хоріона та плаценти.

2.4.2.1. Фіксація клітин ворсин хоріона. Матеріал доставляється до цитогенетичної лабораторії протягом 2-3 годин після маніпуляції. Дозволяється зберігати матеріал протягом доби з дотриманням температурного режиму 4–8°C.

Після отримання матеріалу лабораторією, усі дані про отриманий біологічний матеріал вносили до реєстраційного журналу та приступали до його обробки.

У стерильній пробірці змішуємо 4 мл цитрату натрія та 1 мл колхіцину. Увесь вміст ємності для транспортування з матеріалом переливаємо у

бобовидний судок. За допомогою чистих пінцетів переносимо з нього ворсини хоріона або плаценти (залежить від терміну завмерлої вагітності) у чашку Петрі наповнену фізіологічним розчином для промивки. Ворсини очищуємо від зайвих тканин та кров'яних згустків та подрібнюємо на маленькі частини. Переносимо промиті ворсини у пробірку та лишаємо на 40 хв. у термостаті. Після завершення часу дістаємо пробірку з термостату та доливаємо розчин фіксатору у співвідношенні 1:1 із вмістом пробірки та лишаємо при кімнатній температурі під витяжкою ще на 40 хв. Під час останнього етапу виливаємо весь вміст пробірки у чашку петрі. У пробірку заливаємо 5 мл фіксуючого розчину та переносимо усі ворсини назад у пробірку. Лишаємо на ніч у холодильнику.

2.4.2.2. Виготовлення препаратів. Приготування хромосомних препаратів відбувається обов'язково під витяжною шафою, тому що розчин оцтової кислоти має токсичні випари, які можуть пошкодити слизові оболонки порожнини носу та рота.

Етанолом змочуємо вату та бинт. Ватою протираємо пінцет та обпалюємо над пальником. Бинтом протираємо предметні скельця також обпалюємо над пальником. Чистим пінцетом дістаємо ворсини з пробірки на фільтр папір аби забрати зайву вологу. Перекладаємо ворсини на предметні скельця та крапаємо 3-4 краплі 60% оцтової кислоти. Прогріваємо скельця над пальником з ворсинами та оцтовою кислотою, мацеруємо і розкатуємо краплю з клітинами по скельцю нахилиючи його в різні боки так, щоб крапля не виходила за межі предметного скельця. Перекладаємо ворсини назад у пробірку та сушимо скельця під витяжкою при кімнатній температурі. Коли скельця висохли вони готові до фарбування.

2.4.3. Забарвлення препаратів GTG-методом та їх аналіз. Цей метод диференційного забарвлення полягає у попередній обробці хромосом протеолітичним ферментом трипсином та подальшому фарбуванні барвником Гімза, внаслідок чого формується поперечна посмугованість хромосом. Ділянки гетерохроматину транскрипційно неактивні та пізно реплікуються, тому зафарбовуються сильніше й виглядають як темні смуги, а еухроматинові ділянки

навпаки транскрипційно активні та рано реплікуються, тим самим зафарбовуються слабше і дають світні смуги.

Забарвлюючи препарати GTG-методом на препарат наносили 1 мл 0,25% розчину трипсину нагрітого до температури 37,5 °C та тримали протягом 10-15 сек. Після чого трипсин зливали та одразу наносили робочий розчин барвника Гімза на 3-5 хв. Час обробки трипсином та барвником відрізняється в залежності від кожної серії препаратів та відбирався окремо. Після цього препарат промивали водогінною водою та висушували при кімнатній температурі.

Аналіз препаратів проводили під мікроскопом для каріотипування з камерою та автоматичною програмою, використовуючи імерсійний об'єктив зі збільшенням $\times 100$). Запис каріотипу виконували згідно з «Міжнародною системою для номенклатури в цитогенетиці людини» («An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN-2016»). Усі результати реєстрували у журналі реєстрації цитогенетичних досліджень та вносили до таблиці для порівняння даних, отриманих за допомогою прямого та непрямого методу дослідження із різних біологічних матеріалів протягом двох років.

2.4.4. Статистична обробка даних. Статистичний аналіз даних проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Перевірку статистичних гіпотез проводили на рівні значущості $P \leq 0.05$. Застосовано метод оцінки достовірності різниці середніх величин, основою якого являється визначення критерію Ст'юдента. Його використовують для перевірки гіпотез про достовірність різниці кількісних даних. Ми використовували метод Ст'юдента для незалежних вибірок. Якщо критерій Ст'юдента був рівний або більше двох, тоді виявлення відмінності було достовірним, а якщо менше, то різниця була не доведена.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оптимізація цитогенетичного аналізу (ЦГА).

Цитогенетичний аналіз дозволив нам записувати діагноз спадкового захворювання у вигляді каріотипічної формули [52].

Цитогенетичний метод (метод хромосомного аналізу) ґрунтується на мікроскопічному дослідженні структури і кількості хромосом. Він набув широкого застосування у 20-і роки ХХ ст., коли було отримано перші відомості про кількість хромосом у людини. У 30-х роках були ідентифіковані перші 10 пар хромосом [53].

У 1956 р. шведські вчені Дж. Тийо і А. Леван вперше довели, що у людини 46 хромосом [52].

Цитогенетичний метод використовується для:

- вивчення каріотипів організмів;
- уточнення числа хромосомних наборів, кількості і морфології хромосом для діагностики хромосомних хвороб;
- складання карт хромосом;
- для вивчення геномного і хромосомного мутаційного процесу;
- вивчення хромосомного поліморфізму в людських популяціях [53].

Хромосомний набір людини містить велику кількість хромосом, основні відомості про які можна отримати при вивченні їх в метафазі мітозу і профазі - метафазі мейозу. Клітини людини для прямого хромосомного аналізу ми отримували шляхом пункції кісткового мозку і біопсії гонад, або непрямим методом - шляхом культивування клітин периферичної крові (лімфоцити), коли отримують значну кількість метафаз. Непрямим методом ми досліджували також клітини амніотичної рідини або фібробласти, отримані при амніоцентезі або біопсії хоріона, клітини абортусів, мертвороджених [54].

Частіше ми досліджували хромосоми в лімфоцитах периферичної гепаринізованої крові. Для стимуляції мітозу додавали фітогемаглютинін, а для зупинки мітозу - колхіцин. Препарат забарвлювали ядерними барвниками: 2 % розчином ацеторсеїну, азуреозином, барвником Унна, розчином Гімза та іншими. Накривали покривним скельцем, видаляли надлишок барвника фільтрувальним папером, розглядали під мікроскопом з масляною імерсією [52].

Останнім часом всі дослідження в цитогенетиці людини проводили із застосуванням методів диференційного забарвлення хромосом, які дозволяють відрізнити кожну хромосомну пару. Існує декілька способів забарвлення: Q, G, C, R. У вирішенні питань діагностики хромосомних хвороб різні методи диференційного забарвлення застосовували у комбінації. Завдяки диференційному забарвленню хромосом виявили незначні хромосомні поламки: невеликі делеції, транслокації та інше [52].

Отримавши мікропрепарат, ми вивчали його візуально та складали ідіограму каріотипу, тобто впорядковане розміщення кожної пари хромосом за індивідуальними ознаками відмінностей: загальна довжина хромосоми, форма, розташування центромери [53].

Більшість хромосом за таким методом відносили до певних груп згідно з Денверською класифікацією [52].

Цей метод дозволив діагностувати багато спадкових хвороб, вивчати мутаційний процес, складні перебудови і найменші хромосомні аномалії у клітинах, які вступили у фазу поділу та поза поділом [53].

На хромосомний аналіз направляли пацієнтів з множинними вродженими вадами розвитку, діти з затримкою фізичного і психомоторного розвитку, пацієнти з недиференційованими формами олігофренії (недоумства), з порушенням статевого диференціювання, жінки з порушенням менструального циклу (первинна або вторинна аменорея), сім'ї з безпліддям, жінки зі звичним невиношуванням вагітності (викидні, мертвонароджені) [52].

Для полегшення роботи із культурою амніоцитів ми оптимізували методику культивування амніотичної рідини, адаптувавши її для використання

звичайного сухоповітряного термостату замість високовартісного та вибухонебезпечного CO₂-інкубатора. Завдяки цьому собівартість цитогенетичного аналізу каріотипу плода значно зменшилася, що робить обстеження доступним і безпечним для багатьох цитогенетичних лабораторій України. Така оптимізація є актуальною, особливо під час військового стану.

3.2. Дослідження частоти та спектру аномалій каріотипу ембріона у клітинах ворсин хоріону після мимовільно втрачених вагітностей (МВВ) методом ЦГА.

За 2022 рік було проведено 205 цитогенетичних аналізів, з них 184 (89,7%) успішних з виданим результатом каріотипу (таблиця 3.3.1). У 21 випадку з проведених аналізів не вдалося отримати метафазні пластинки хромосом через фактори транспортування, забору матеріалу або іншого фактору. За період з 01 січня по вересень 2023 року проведено 185 цитогенетичних аналізів, з них із виданим результатом було 178 (96,2%), і різниця в успішності виконання аналізу була значуще більшою порівняно з 2022 роком, $p < 0,05$ (таблиця 3.2.1).

Таблиця 3.2.1

Структура каріотипів ембріонів в матеріалі мимовільно втрачених вагітностей

Варіанти каріотипів	2022 (від 01.01 по 31.12)		2023 (від 01.01 по 01.09)	
	Кількість випадків	%	Кількість випадків	%
Нормальний каріотип	61	33	51	29
Трисомія 21	13	7	16	9
Трисомія 13	13	7	10	6
Трисомія 18	13	7	10	6
Трисомія 16	16	9	22	12

Трисомія 14	2	1	-	-
45,X0	20	11	15	8
Додаткова маркерна хромосома (mar)	19	10	27	15
Триплоїдія	23	12,5	20	11
Тетраплоїдія	2	1	2	1
47,XXY	2	1	1	0,6
Всього	184	100	178	100

Використання стандартного цитогенетичного методу дозволило встановити, що серед завмерлих вагітностей у 2022 році частка нормальних каріотипів (рис.3.2.1) складала 33% (61/184). Решта 123 каріотипи (67%) були патологічними і включали у себе десять різних нозологічних форм хромосомної патології. За спектром хромосомні аномалії включали: анеуплоїдію аутосом - 31% (рис.3.2.2), поліплоїдію (триплоїдію та тетраплоїдію) – 13,5% (рис.3.2.3), анеуплоїдію гоносом (моносомія X, трисомія X, дисомія Y, с.Кляйнфельтера – 47,XXY) – 12% (рис.3.2.4). Серед аномалій каріотипу переважали: триплоїдія (12,5% від усієї патології), моносомія X (11% від усієї патології) та додаткова маркерна хромосома невідомого походження (mar) – 10% від усієї патології.



Рис.3.2.1. Метафазна пластинка нормального каріотипу людини (метод диференційного фарбування, GTG-метод). В одному взірці досліджено ~ 15 метафазних пластинок.



Рис.3.2.2. Метафазні пластинки анеуплоїдії аутосом (1)трисомією 21, 2)трисомією 18 3)трисомією 13) каріотипу людини (метод диференційного фарбування, GTG-метод). В одному візці досліджено ~ 30 метафазних пластинок. Стрілками позначено додаткову хромосому.



Рис.3.2.3. Метафазна пластинка триплоїдного каріотипу людини (метод диференційного фарбування, GTG-метод). В одному візці досліджено ~ 30 метафазних пластинок.

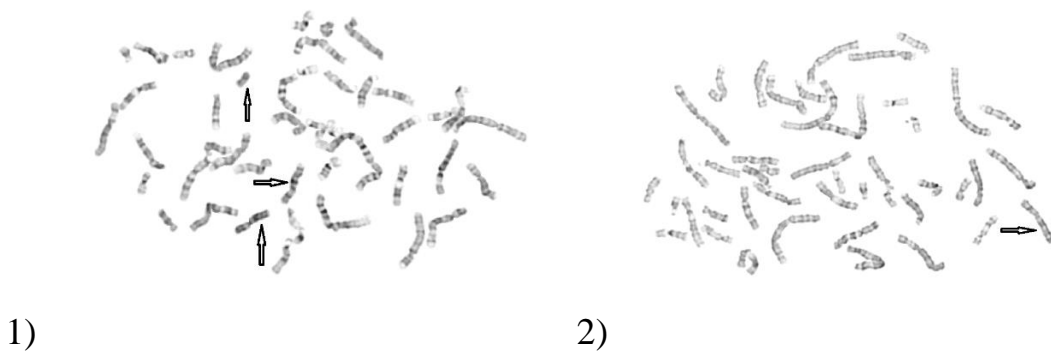


Рис.3.2.4. Метафазні пластинки анеуплоїдії гоносом каріотипу людини (метод диференційного фарбування, GTG-метод). В одному візці досліджено ~ 30

метафазних пластинок. Стрілками позначено на першій картинці синдром Клайнфельтера, на другому – моносомія Х-хромосоми.

Спектр та частоту анеуплоїдії аутосом представлено на рис. 3.2.5.

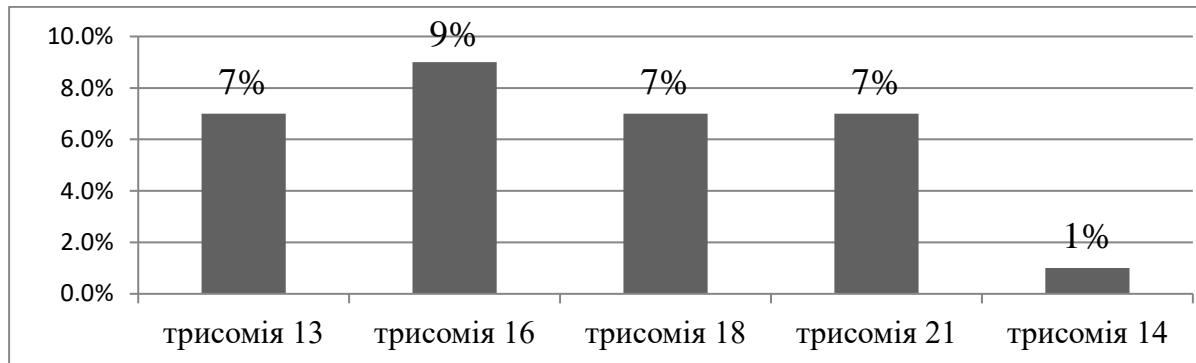


Рис.3.2.5 Частота ключових аутосомних трисомій у матеріалі завмерлої вагітності за 2022 р.

У 2023 році нормальний хромосомний набір у матеріалі завмерлих вагітностей був зареєстрований у 29% (51/178). Спектр виявлених хромосомних аномалій, які склали 71%, відрізнявся від попереднього року і включав: анеуплоїдію аутосом - 33%, поліплоїдію (триплоїдію та тетраплоїдію) – 12%, анеуплоїдію гоносом (моносомія Х, трисомія Х, дисомія Y, с.Кляйнфельтера – 47,XXY) – 8,6%. Серед аномалій каріотипу переважали: додаткова маркерна хромосома невідомого походження (mar) – 15% від усієї патології, трисомія 16 (12% від усієї патології), та триплоїдія (11% від усієї патології). Спектр та частоту анеуплоїдії аутосом представлено на рис. 3.2.6.

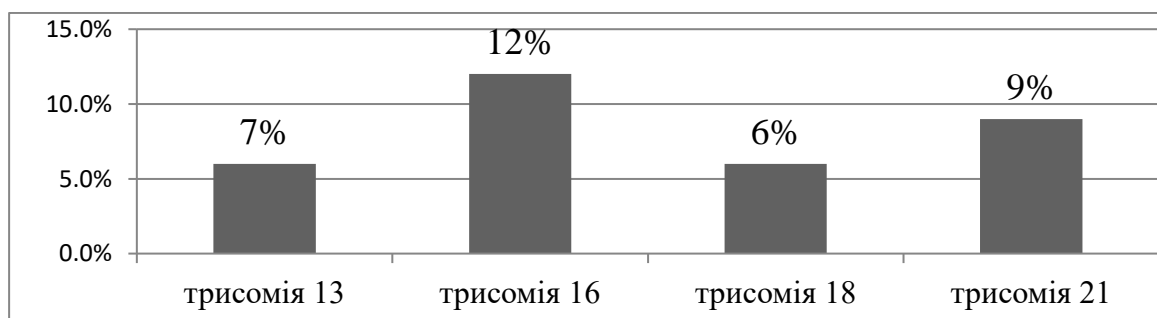


Рис.3.2.6. Частота ключових аутосомних трисомій у матеріалі завмерлих вагітностей за 2023 р.

Порівнюючи дані за два роки можна зробити висновок, що у 2023 році:

- 1) кількість нормальних каріотипів зменшилась на 4%;
- 2) на 5% збільшилась кількість маркерних хромосом;
- 3) кількість аутосомних трисомій зросла на 2%;
- 4) на 3,4% зменшилася кількість анеуплоїдій гоносом.

Отже, проаналізовані каріотипи ембріонів рано втрачених вагітностей підтверджують літературні дані щодо того, що біля 65-70% 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.

3.3. Дослідження частоти та спектру аномалій каріотипу плода у біологічному матеріалі під час інвазивної діагностики методом ЦГА.

Проаналізовано результати інвазивної діагностики (взяття матеріалу плода) з наступним цитогенетичним аналізом. За 2022 рік проведено 354 пренатальних цитогенетичних досліджень. З проаналізованих препаратів було отримано отримали 238 результатів з нормальним каріотипом, що становить 67%. Патологічний каріотип плода зареєстровано в 116 випадках (33%). Отже, частота виявлення патологічного каріотипу плода складала в середньому 1 на 3 інвазивних маніпуляції, що є високим показником і свідчить про ефективне формування груп високого ризику для проведення інвазивної діагностики.

За період з 01 січня по вересень 2023 року проведено 372 інвазивних маніпуляції і відповідно цитогенетичних аналізи. З проаналізованих препаратів отримано 300 результатів з нормальним каріотипом, що становить 80% (таблиця 3.3.1).

Таблиця 3.3.1

Структура каріотипів плода в амніотичній рідині і біоптаті плаценти

Варіанти каріотипів	2022 (від 01.01 по 31.12)		2023 (від 01.01 по 01.09)	
	Кількість випадків	%	Кількість випадків	%
Нормальний каріотип	238	67	300	80
Трисомія 21	43	12	44	12
Трисомія 13	3	0,9	1	0,3
Трисомія 18	12	3,5	9	2,5
Трисомія 16	-	-	1	0,3
45,X0	4	1	6	1,6
Додаткова маркерна хромосома (mar)	1	0,3	3	0,8
Триплоїдія	1	0,3	4	1
47,XXY	2	0,6	2	0,5
Дереватна хромосома (der)	7	2	2	0,5
Делеція частини хромосоми (del)	-	-	1	0,3
Всього	354	100	372	100

Застосування модифікованого цитогенетичного методу культивування амніоцитів дозволило встановити, що у пренатальній інвазивній діагностиці за 2022 рік переважають результати із нормальним каріотипом, та становлять 238 результатів із 354 проаналізованих зразків, що становить 67%. Інші 116 результатів, а саме 33%, включають у себе десять різних патологій. За спектром хромосомні аномалії включали: анеуплоїдію аутосом - 16,4%, структурні перебудови – 2%, анеуплоїдію гоносом (моносомія X, трисомія X, дисомія Y, с.Кляйнфельтера – 47,XXY) – 1,6%. Серед аномалій каріотипу переважали:

трисомія 21 (12% від усієї патології), дзеркатна хромосома (2% від усієї патології) та моносомія X (1% від усієї патології). Спектр та частоту основної анеуплоїдії аутосом представлено на рис.3.3.1.

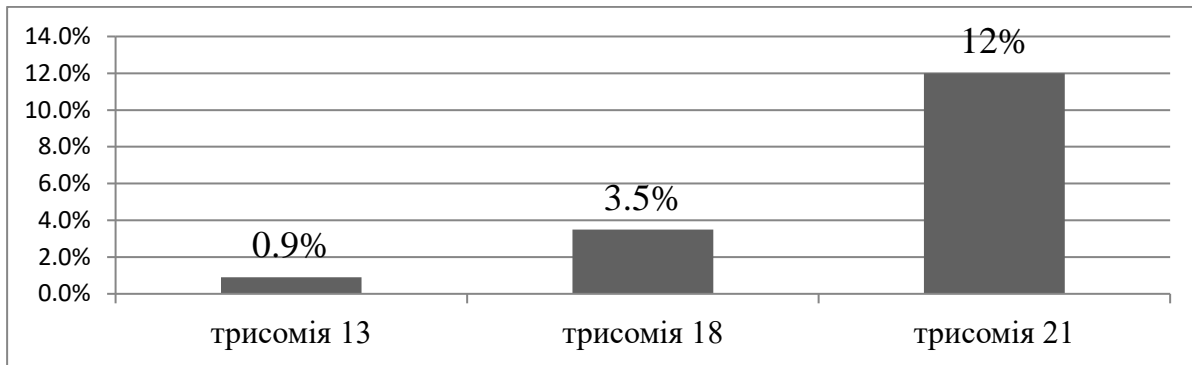


Рис.3.3.1 Частота ключових аутосомних трисомій у матеріалах інвазивної діагностики за 2022 р.

Аналіз випадків інвазивної діагностики за період від січня по вересень 2023 року, досліджених із застосуванням модифікованого цитогенетичного методу, показав, що зі 372 проаналізованих зразків, 300 результатів (80%) мали нормальний каріотип. За спектром хромосомні аномалії включали: анеуплоїдію аутосом - 15,1%, анеуплоїдію гоносом (моносомія X, трисомія X, дисомія Y, с.Кляйнфельтера – 47,XXY) – 2,1% та поліплоїдію (триплоїдію та тетраплоїдію) – 12%. Серед аномалій каріотипу переважали: трисомія 21 (12% від усієї патології), трисомія 18 (2,5% від усієї патології) та моносомія X (1,6% від усієї патології). Спектр та частоту анеуплоїдії аутосом представлено на рис.3.3.2.

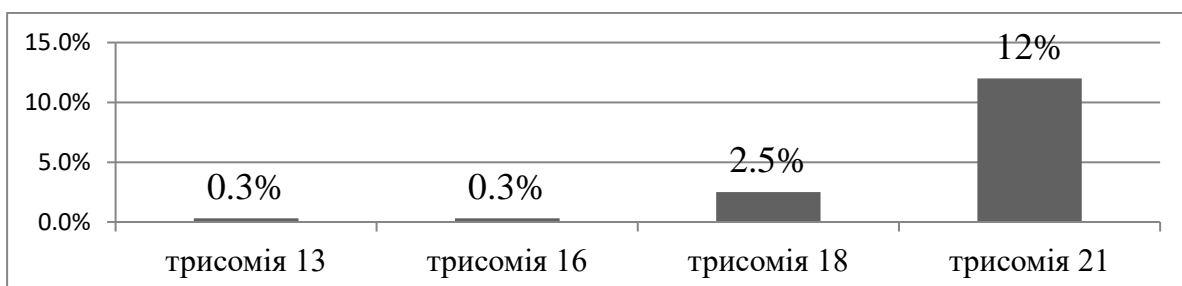


Рис. 3.3.2 Частота ключових аутосомних трисомій у матеріалах інвазивної діагностики за 2022 р.

Порівняльний аналіз частоти та спектру хромосомної патології плода за результатами інвазивної діагностики дозволяє зробити висновок, що у 2023 році:

- 1) кількість нормальних каріотипів збільшилась на 13%;
- 2) на 1,5% зменшилась кількість дериватних хромосом;
- 3) кількість аутосомних трисомій зменшилася на 1,3%;
- 4) на 0,5% збільшилася кількість анеуплоїдій гоносом.

3.4. Аналіз корелятивних зв'язків між ймовірністю отримання аномального каріотипу та видом досліджуваного біологічного матеріалу.

Проведено порівняння загальної частоти виявлення хромосомної патології і окремих нозологічних форм хромосомних аномалій у матеріалі втрачених вагітностей і в матеріалі вагітностей, що розвивалися.

Статистичний аналіз даних проводили за методом оцінки достовірності різниці показників (середніх величин), який дозволяє встановити, чи виявлені відмінності істотні, чи вони є результатом дії випадкових причин. Перевірку статистичних гіпотез проводили на рівні значущості $P \leq 0,05$. Для встановлення вірогідності відхилень аномалій каріотипу використовували критерій достовірності - критерію Ст'юдента (t), значення якого обчислювали по формулі:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

Де M_1 - середнє значення змінної за однією вибіркою даних, M_2 - середнє значення змінної за іншою вибіркою даних, m_1 і m_2 – інтегровані показники відхилень частотних значень з двох порівнюваних вибірок від відповідних середніх величин.

Результати представлені у таблиці 3.4.1.

Таблиця 3.4.1

Залежність ймовірності отримання результату ЦГА «нормальний каріотип» або «аномалія розвитку плода» від типу біологічного матеріалу

Каріотип	Абортивний матеріал, середнє відсоткове (%) значення отриманих результатів дослідження у 2022-2023 рр. (M±m, n=262)	Інвазивна діагностика, середнє відсоткове (%) значення отриманих результатів дослідження у 2022-2023 рр. (M±m, n=726)	P*, рівень статистичної значущості – ймовірність вірогідної різниці у значеннях обох досліджуваних груп
1	2	3	4
Нормальний каріотип	31±2	73,5±6,5	p≤0,05
Трисомія 21	8±1	12±0	p≤0,05
Трисомія 13	6,5±0,5	0,6±0,3	p≤0,05
Трисомія 18	6,5±0,5	3±0,5	p≤0,05
Трисомія 16	10,5±1,5	0,15±0,15	p≤0,05
45,X0	9,5±1,5	1,3±0,3	p≤0,05
Mar	12,5±2,5	0,55±0,25	p≤0,05
Триплоїдія	11,5±0,75	0,65±0,35	p≤0,05
47,XXY	0,8±0,2	0,55±0,05	p≥0,05

Примітка * p≤0,05 – порівнювані вибірки є значущо відмінними

Досліджуючи абортівний матеріал та біоматеріал інвазивної діагностики (таблиця 3.3.3), статистично достовірною виявилася кореляція між втраченими вагітностями та мутаціями: трисомія 21, 13, 18 та 16 (p≤0,05). Це доводить, що

мутації триплоїдія (43 випадки у абортівному матеріалі та 5 випадків при інвазивній діагностиці), трисомія 13 (23 випадки у абортівному матеріалі та 4 випадки інвазивної діагностики), 18 (23 випадки у абортівному матеріалі та 21 випадок інвазивної діагностики) та 16 (38 випадків у абортівному матеріалі та 1 випадок інвазивної діагностики) є летальними. Проте, мутації 47,XXY у двох випадках 2022 року та одному випадку у 2023 році у абортівному матеріалі та по два випадки у 2022 та 2023 роках при інвазивній діагностиці є статистично недостовірним і не корелюють з ранньою втратою вагітності, відповідно до отриманих нами даних.

Аналогічне порівняння у частоті хромосомних порушень було проведено і між двома роками, протягом яких проводилося дослідження. Результати представлені у таблиці 3.4.2.

Таблиця 3.4.2

Залежність ймовірності отримання результату ЦГА «нормальний каріотип» або «аномалія розвитку плода» від року проведення досліджень

Каріотип	Абортівний матеріал, середнє відсоткове (%) значення отриманих результатів дослідження у 2022-2023 рр. (M±m, n=262)	Інвазивна діагностика, середнє відсоткове (%) значення отриманих результатів дослідження у 2022-2023 рр. (M±m, n=726)	P*, рівень статистичної значущості – ймовірність вірогідної різниці у значеннях обох досліджуваних груп
1	2	3	4
Нормальний каріотип	50±17	54,5±25,5	p≥0,05

Трисомія 21	9,5±2,5	10,5±1,5	p≥0,05
Трисомія 13	3,95±3,05	3,15±2,85	p≥0,05
Трисомія 18	5,25±1,75	4,25±1,75	p≥0,05
Трисомія 16	4,5±4,5	6,5±5,85	p≥0,05
45,X0	6±5	4,8±3,2	p≥0,05
Mar	5,15±4,85	7,9±7,1	p≥0,05
Триплоїдія	6,4±6,1	6±5	p≥0,05
47,XXY	0,8±0,2	0,55±0,05	p≥0,05

Примітка * $p \leq 0,05$ – порівнювані вибірки є значущо відмінними

Аналіз таблиці свідчить, що випадки трисомії 21 частіше фіксувались у досліджуваній групі 2023 року, але різниця незначуща ($p \geq 0,05$). Випадки додаткової маркерної хромосоми (mar) у 2023 році також були дещо частішими (30 випадків) порівняно з такою у 2022 році (20 випадків), але також без статистичної різниці ($p \geq 0,05$). Аналогічно, не знайдено вірогідних відмінностей у частоті трисомії 18 у 2023 році (19 випадків) у порівнянні з 2022 роком (25 випадків), ($p \geq 0,05$).

Отже, порівняльний аналіз свідчить, що ймовірність знайти патологічний каріотип залежить від типу біологічного матеріалу і є значуще вищою в матеріалі рано втрачених вагітностей. Залежності в частоті нормального та патологічного каріотипу залежно від року не виявлено.

Результати магістерської роботи дозволяють висловити припущення, що молекулярно-генетичні механізми ранніх втрат вагітності значною мірою зумовлені числовими хромосомними порушеннями, що призводить до елімінації нежиттєздатного потомства вже на ранніх етапах внутрішньоутробного розвитку організму людини. Подальше продовження досліджень з цього напрямку є актуальним і перспективним.

ВИСНОВКИ

1. Оптимізовано методику культивування клітин амніотичної рідини для отримання метафазних пластинок хромосом і показано можливість проводити культивування за допомогою звичайного сухоповітряного термостату, що зумовлює зниження собівартості цитогенетичного аналізу каріотипу плода.
2. Аномалії каріотипу за 2022-2023 роки встановлені у 67% та 71%, відповідно, зразків ранніх репродуктивних втрат із наступною частотою у порядку спадання: аутосомна анеуплоїдія – 31% та 33%, поліплоїдія – 13,5% та 12%, анеуплоїдія статевих хромосом – 12% та 8,6%. Основними аутосомними трисоміями у матеріалі втрачених вагітностей були трисомія 21 (7% та 9%), трисомія 13 (7% та 6%), трисомія 18 (7% та 6%), трисомія 16 (9% та 12%), трисомія 14 (1%).
3. Аномалії каріотипу за 2022-2023 роки встановлені в 33% та 20%, відповідно, матеріалах інвазивної пренатальної діагностики із наступною частотою у порядку спадання: аутосомна анеуплоїдія – 16,4% та 33%, структурні перебудови – 2% та 12%, анеуплоїдія статевих хромосом – 1,6% та 8,6%. Основними аутосомними трисоміями у матеріалі втрачених вагітностей були трисомія 21 (12% та 12%), трисомія 13 (0,9% та 0,3%), трисомія 18 (3,5% та 2,5%), трисомія 16 (0,3% у 2023 році).
4. Ймовірність знайти патологічний каріотип залежить від типу біологічного матеріалу і є значуще вищою в матеріалі рано втрачених вагітностей порівняно з вагітностями, що розвиваються ($p < 0,05$).
5. Доведено, що хромосомні мутації триплоїдія, трисомія 13, трисомія 18 та трисомія 16 є летальними і призводять до елімінації ембріонів на ранніх етапах внутрішньоутробного розвитку. Аномалії статевих хромосом (каріотип 47,XXY) не роблять внесок у рано втрачені вагітності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Zhang L, Vijg J. Somatic Mutagenesis in Mammals and Its Implications for Human Disease and Aging. *Annu Rev Genet.* 2018 Nov 23;52:397-419.
2. Ayatollahi H, Keramati MR, Shirdel A, Kooshyar MM, Raiszadeh M, Shakeri S, Sadeghian MH. BCR-ABL fusion genes and laboratory findings in patients with chronic myeloid leukemia in northeast Iran. *Caspian J Intern Med.* 2018 Winter;9(1):65-70.
3. Ribeil JA, Hacein-Bey-Abina S, Payen E, Magnani A, Semeraro M, Magrin E, Caccavelli L, Neven B, Bourget P, El Nemer W, Bartolucci P, Weber L, Puy H, Meritet JF, Grevent D, Beuzard Y, Chrétien S, Lefebvre T, Ross RW, Negre O, Veres G, Sandler L, Soni S, de Montalembert M, Blanche S, Leboulch P, Cavazzana M. Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *N Engl J Med.* 2017 Mar 02;376(9):848-855.
4. McHugh DR, Steele MS, Valerio DM, Miron A, Mann RJ, LePage DF, Conlon RA, Cotton CU, Drumm ML, Hodges CA. A G542X cystic fibrosis mouse model for examining nonsense mutation directed therapies. *PLoS One.* 2018;13(6):e0199573.
5. Lenski RE. What is adaptation by natural selection? Perspectives of an experimental microbiologist. *PLoS Genet.* 2017 Apr;13(4):e1006668.
6. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.* 2017 Jun;58(5):235-263.
7. Hryhorowicz M, Lipiński D, Zeyland J, Słomski R. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2017 Jun;65(3):233-240.
8. Carlson ES, Upadhyaya P, Hecht SS. A General Method for Detecting Nitrosamide Formation in the In Vitro Metabolism of Nitrosamines by Cytochrome P450s. *J Vis Exp.* 2017 Sep.
9. Basu AK. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 23;19(4).

10. Tomasetti C, Li L, Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*. 2017 Mar 24;355(6331):1330-1334.
11. Andreotti G, Freedman ND, Silverman DT, Lerro CC, Koutros S, Hartge P, Alavanja MC, Sandler DP, Freeman LB. Tobacco Use and Cancer Risk in the Agricultural Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2017 May;26(5):769-778.
12. Campos MC, Phelan J, Francisco AF, Taylor MC, Lewis MD, Pain A, Clark TG, Kelly JM. Genome-wide mutagenesis and multi-drug resistance in American trypanosomes induced by the front-line drug benznidazole. *Sci Rep*. 2017 Oct 31;7(1):14407.
13. Ségurel L, Wyman MJ, Przeworski M. Determinants of mutation rate variation in the human germline. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2014;15:47–70.
14. Kunkel TA, Erie DA. Eukaryotic mismatch repair in relation to DNA replication. *Annu Rev Genet*. 2015;49:291–313.
15. Shendure J, Akey JM. The origins, determinants, and consequences of human mutations. *Science*. 2015;349:1478–83.
16. Gao Z, Wyman MJ, Sella G, Przeworski M. Interpreting the dependence of mutation rates on age and time. *PLoS Biol*. 2016;14:e1002355. Jacobs, P.A., Baikie, A.G., Court Brown, W.M. and Strong, J.A. (1959) The somatic chromosomes in mongolism. *Lancet*, 1, 710.
17. Hall, H., Chan, E.R., Collins, A., Judis, L., Sofia, S., Surti, U., Hoffner, L., Cockwell, A., Jacobs, P.A. and Hassold, T. (in press) The origin of trisomy 13. *Am. J. Med. Genet*.
18. Hall, H., Surti, U., Hoffner, L., Shirley, S., Feingold, E. and Hassold, T. (in press) The origin of trisomy 22: evidence for acrocentric chromosome-specific patterns of nondisjunction. *Am. J. Med. Genet*.
19. Reprint of *Cytogenetic and Genome Research* (ISSN 1424-8581), Vol. 160, No. 7-8, 2020

20. Murphy E. (2018) Forensic DNA typing. *Annu. Rev. Criminol.* 1, 497–515 10.1146/annurev-criminol-032317-092127
21. Bonora G. and Disteche C.M. (2017) Structural aspects of the inactive X chromosome. *Phil. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, 20160357, (and others in this volume of 12 contributions to a discussion meeting issue ‘X-chromosome inactivation: a tribute to Mary Lyon’) 10.1098/rstb.2016.0357
22. Pinheiro I. and Heard E. (2017) X chromosome inactivation: new players in the initiation of gene silencing. *F1000 Res.*, 6, 344–354 10.12688/f1000research.10707.1
23. Stevant I., Papaioannour M.D. and Nef S. (2018) A brief history of sex determination. *Mol. Cell. Endocrinol.* 10.1016/j.mce.2018.04.004
24. Ornitz D.M. and Legeai-Mallet L. (2017) Achondroplasia: development, pathogenesis, and therapy. *Dev. Dyn.* 246, 291–309 10.1002/dvdy.24479
25. Genomics England, 100,000 genomes project, 2018.
26. Rehm H.L. (2017) Evolving healthcare through personal genomics. *Nat. Rev. Genet.* 18, 259–267 10.1038/nrg.2016.162
27. Holmes G. Gastrointestinal disorders in Down syndrome. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2014 Winter;7(1):6-8.
28. Asim A, Kumar A, Muthuswamy S, Jain S, Agarwal S. "Down syndrome: an insight of the disease". *J Biomed Sci.* 2015 Jun 11;22(1):41.
29. Agathokleous M, Chaveeva P, Poon LC, Kosinski P, Nicolaides KH. Meta-analysis of second-trimester markers for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013 Mar;41(3):247-61.
30. Renna MD, Pisani P, Conversano F, Perrone E, Casciaro E, Renzo GC, Paola MD, Perrone A, Casciaro S. Sonographic markers for early diagnosis of fetal malformations. *World J Radiol.* 2013 Oct 28;5(10):356-71.
31. Skotko BG, Davidson EJ, Weintraub GS. Contributions of a specialty clinic for children and adolescents with Down syndrome. *Am J Med Genet A.* 2013 Mar;161A(3):430-7.

32. Samplaski MK, Lo KC, Grober ED, Millar A, Dimitromanolakis A, Jarvi KA. Phenotypic differences in mosaic Klinefelter patients as compared with non-mosaic Klinefelter patients. *Fertil Steril*. 2014;101(4):950–955. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.051.
33. Chang S, Skakkebaek A, Trolle C, Bojesen A, Hertz JM, Cohen A, Hougaard DM, Wallentin M, Pedersen AD, Ostergaard JR, Gravholt CH. Anthropometry in Klinefelter syndrome—multifactorial influences due to CAG length, testosterone treatment and possibly intrauterine hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(3):E508–E517. doi: 10.1210/jc.2014-2834.
34. Rocca MS, Pecile V, Cleva L, Speltra E, Selice R, Di Mambro A, Foresta C, Ferlin A. The Klinefelter syndrome is associated with high recurrence of copy number variations on the X chromosome with a potential role in the clinical phenotype. *Andrology*. 2016;4(2):328–334. doi: 10.1111/andr.12146.
35. Stephanie L. Gaw, Lawrence D. Platt, in *Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care (Second Edition)*, 2018.
36. Levy PA, Marion R. Trisomies. *Pediatr Rev*. 2018 Feb;39(2):104-106.
37. Chang-Hui Shen, in *Diagnostic Molecular Biology (Second Edition)*, 2023
38. Gravholt CH, Andersen NH, Conway GS, Dekkers OM, Gefner ME, Klein KO, et al. Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: proceedings from the 2016 Cincinnati International Turner Syndrome Meeting. *Eur J Endocrinol*. 2017;177(3):G1–70.
39. Cui X, Cui Y, Shi L, Luan J, Zhou X, Han J. A basic understanding of Turner syndrome: Incidence, complications, diagnosis, and treatment. *Intractable Rare Dis Res*. 2018 Nov;7(4):223-228.
40. Bernard V, Donadille B, Le Poulennec T, Nedelcu M, Martinerie L, Christin-Maitre S. Management of endocrine disease: transition of care for young adult patients with Turner syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2019;180(1):R1–7
41. Lin AE, Prakash SK, Andersen NH, Viuf MH, Levitsky LL, Rivera-Davila M, et al. Recognition and management of adults with Turner syndrome:

from the transition of adolescence through the senior years. *Am J Med Genet A*. 2019;179(10):1987–2033.

42. Li P, Cheng F, Xiu L. Height outcome of the recombinant human growth hormone treatment in Turner syndrome: a meta-analysis. *Endocr Connect*. 2018;7(4):573–83.

43. Gault EJ, Cole TJ, Casey S, Hindmarsh PC, Betts P, Dunger DB, et al. Effect of oxandrolone and timing of pubertal induction on final height in Turner syndrome: final analysis of the UK randomised placebo-controlled trial. *Arch Dis Child*. 2021;106(1):74–6.

44. Mortensen KH, Young L, De Backer J, Silberbach M, Collins RT, Duijnhouwer AL, Pandya B, Gravholt CH, Lopez L, Roos-Hesselink JW. Cardiovascular imaging in Turner syndrome: state-of-the-art practice across the lifespan. *Heart*. 2018 Nov;104(22):1823-1831.

45. Klein KO, Rosenfield RL, Santen RJ, Gawlik AM, Backeljauw PF, Gravholt CH, Sas TCJ, Mauras N. Estrogen Replacement in Turner Syndrome: Literature Review and Practical Considerations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018 May 01;103(5):1790-1803.

46. Goel N, Morris JK, Tucker D, de Walle HEK, Bakker MK, Kancherla V, Marengo L, Canfield MA, Kallen K, Lelong N, Camelo JL, Stallings EB, Jones AM, Nance A, Huynh MP, Martínez-Fernández ML, Sipek A, Pierini A, Nembhard WN, Goetz D, Rissmann A, Groisman B, Luna-Muñoz L, Szabova E, Lapchenko S, Zarante I, Hurtado-Villa P, Martinez LE, Tagliabue G, Landau D, Gatt M, Dastgiri S, Morgan M. Trisomy 13 and 18-Prevalence and mortality-A multi-registry population based analysis. *Am J Med Genet A*. 2019 Dec;179(12):2382-2392.

47. Kepple JW, Fishler KP, Peebles ES. Surveillance guidelines for children with trisomy 18. *Am J Med Genet A*. 2021 Apr;185(4):1294-1303.

48. Zhen L, Li YJ, Yang YD, Li DZ. The role of ultrasound in women with a positive NIPT result for trisomy 18 and 13. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2019 Nov;58(6):798-800.

49. Cammarata-Scalisi F, Lacruz-Rengel MA, Araque D, Da Silva G, Avendaño A, Callea M, Stock F, Guerrero Y, Aguilar E, Lacruz MJ, Sulbaran J. [Mosaic trisomy 18. Series of cases]. Arch Argent Pediatr. 2017 Jun 01;115(3):e183-e186.
50. Toufaily MH, Roberts DJ, Westgate MN, Holmes LB. Triploidy: Variation of Phenotype. AM J Clin Pathol. 2016 Jan; 145(1):86-95. doi: 10.1093/ajcp/aqv012
51. Jewell R, Birch A, Roberts P, et al. Phenotypic features of diploid/triploid mosaicism in an adult. Clin Dysmorphol. 2014;23:56-59
52. Саляк Н.О. Навчальний посібник з медичної генетики : навч. посібник / Н. О. Саляк, М. С. Панкевич; за ред. М. Б. Шегедин. – 2-е вид., випр. – К. : ВСВ «Медицина», 2015. – 144 с.
53. Руднік Н. Роль цитогенетичної діагностики у виявленні хромосомної патології та поліморфізм хромосом у постнатальному періоді розвитку у Волинській області / Н. М. Руднік, Т. Я. Шевчук, Т. Ф. Поручинська // Науковий вісник СНУ імені Лесі Українки. Серія: Біологічні науки. – 2015. – №2 (302). – С. 204-211.
54. Шевчук Т.Я. Сучасні проблеми спадковості : робоча програма навчальної дисципліни / Тетяна Яківна Шевчук. – Луцьк, 2013. – 20 с.