

Молекулярное кариотипирование (aCGH) как современный подход к исследованию причин невынашивания беременности*

Никитина Т.В.¹, Кашеварова А.А.¹, Скрябин Н.А.¹,
Чечеткина Н.Н.¹, Мельников А.А.², Лебедев И.Н.¹

¹ — ФГБУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, г.Томск, ул. Набережная р. Ушайки, 10; факс +7(3822) 51-37-44, e-mail:

² — ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, г.Томск, пер. Кооперативный, д. 5; факс +7(3822) 51-40-97

В первом триместре 15–20% клинически распознаваемых беременностей заканчиваются спонтанными абортми, причиной которых в половине случаев являются хромосомные аномалии у эмбриона. Выявление таких аномалий помогает оценить повторный риск при будущих беременностях. Однако кариотип эмбриона зачастую не может быть установлен методом стандартного цитогенетического анализа вследствие неудач культивирования или контаминации культур клетками материнского происхождения, а также при наличии субмикроскопических перестроек. Матричная сравнительная геномная гибридизация (aCGH) позволяет преодолеть эти ограничения и установить с высоким разрешением реальный хромосомный статус плода. Кроме того, эта технология даёт возможность исследовать вариации крупных блоков повторов (CNV) с целью поиска вариантов, связанных с невынашиванием беременности. В конечном итоге, это поможет выявить гены, нарушения в которых приводят к остановке эмбрионального развития.

Ключевые слова: невынашивание беременности; спонтанные аборты; матричная сравнительная геномная гибридизация (aCGH); вариации крупных блоков повторов (CNV)

Введение

Невынашивание — самое частое осложнение беременности — представляет собой спонтанное её прерывание до того, как плод достигнет жизнеспособности. Таким образом, эта категория включает в себя все случаи эмбриональной гибели, произошедшие от зачатия до 22 недель развития плода. Эти потери составляют 15–20% клинически распознаваемых беременностей и более половины всех зачатий [24]. И если потеря зиготы до стадии имплантации проходит для женщины незамеченной, то при клинически установленной беременности гибель эмбриона или плода является зачастую психотравмирующей ситуацией, особенно в случаях привычного невынашивания. Поэтому информация о причинах прерывания беременности очень важна для выбора тактики последующего лечения, чтобы не подвергать пациенток неоправданной терапии, и для оценки прогноза повторного риска в последующем.

Традиционно считается, что чем раньше в эмбриогенезе произошла гибель зародыша, с тем большей вероятностью она обусловлена генетическими причинами, тогда как другие неблагоприятные факторы (гормональные, инфекционные и т.п.) вносят вклад на более поздних сроках беременности. Тем не менее, почти сорокалетний опыт исследования цитогенетических причин ранней эмбриональной гибели выявляет их не более чем

в половине случаев спонтанных абортов. Всего классическими методами цитогенетики (анализ дифференциально окрашенных метафазных хромосом эмбриональных или экстраэмбриональных клеток) с 1975 года прокаротипировано более 15 тыс. абортусов. Средняя частота выявления аномалий кариотипа составила 50% и колебалась в различных исследованиях от 23 до 83% [3, 14, 18, 22, 35]. Несомненно, что на этот показатель влияют особенности формирования выборки (срок беременности, диагноз), способ получения хромосомных препаратов (длительное или кратковременное культивирование клеток, «прямые» препараты), тип анализируемых тканей. В то же время тот факт, что видимые цитогенетические аномалии не обнаружены у половины погибших эмбрионов, предполагает необходимость более детального изучения данной категории зародышей.

Традиционные цитогенетические методы анализа кариотипа спонтанных абортусов требуют успешного культивирования для анализа метафазных пластинок. Вследствие сниженной пролиферативной активности клеток некоторых эмбрионов препараты хромосом бывает невозможно получить [2, 16]. Следует учитывать и тот факт, что остановка развития беременности часто происходит за длительное время до клинического установления этого факта, прерывания беременности и постановки культуры, что также снижает способность клеток к активному делению *in vitro*. Кроме того, невозмож-

* Исследования коллектива авторов в данной предметной области поддержаны соглашениями о грантах №№8276 и 8720 в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

но кариотипирование инфицированных образцов. Еще одно серьёзное препятствие к установлению кариотипа плода — высокая вероятность контаминации культуры эмбриональных клеток клетками материнского происхождения (материнская контаминация, МК). В зависимости от методических особенностей работы частота МК может составлять до 30% от кариотипов 46,XX [5, 19, 23]. Вследствие перечисленных причин стандартное кариотипирование при невынашивании беременности может оказаться неуспешным в половине случаев [13], а средняя оценка невыявления кариотипа плода составляет 20% [31]. Это может приводить к недооценке частоты цитогенетических аномалий при невынашивании беременности.

Другим ограничением технологии стандартного кариотипирования является разрешающая способность, не превышающая, как правило, 5 млн п.н., что не позволяет выявлять более мелкие хромосомные перестройки.

Для преодоления перечисленных проблем используются дополнительные молекулярные и молекулярно-цитогенетические методы: флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), количественная флуоресцентная полимеразная цепная реакция — ПЦР (QF-PCR), мультиплексная лигазная реакция (MLPA), сравнительная геномная гибридизация (CGH). Однако все они имеют наряду с преимуществами и свои недостатки, которые не позволяют регистрировать все типы хромосомных нарушений и, следовательно, использовать данные технологии в качестве основного метода исследования. Поэтому «золотым стандартом» генетики спонтанных абортусов остаётся классическое кариотипирование. Однако в последнее время все больше исследователей проявляют интерес к методу матричной сравнительной геномной гибридизации (array-based comparative genomic hybridization), которое даже называют *виртуальным кариотипированием*. Это объясняется тем, что матричная CGH позволяет:

- 1) установить хромосомную конституцию эмбрионов, кариотип которых нельзя получить методами классической цитогенетики;
- 2) обнаружить субмикроскопические перестройки.

Матричная CGH в исследовании хромосомных аномалий у спонтанных абортусов

Матричная сравнительная геномная гибридизация (array-CGH, aCGH, DNA-microarrays, ДНК-микрочипы, ДНК-биочипы, микроматрицы) — сравнительно недавно [33] появившаяся технология, позволяющая с высоким разрешением проводить комплексное изучение всего генома.

Эта технология основана на принципах сравнительной геномной гибридизации (CGH). Дифференциально меченная контрольная или референсная ДНК (обычно меченная красным флуорохромом) и ДНК пациента или тестируемая ДНК (меченная зелёным) совместно гибридизуются с мелкими фрагментами ДНК человека, нанесёнными в определённом порядке на стеклянный

слайд (микрочип). Различия между избытком и потерей фрагмента или сбалансированный статус основаны на соотношении флуоресценции зелёного и красного сигналов для каждого фрагмента ДНК. Далее с помощью специальных программ обработки все ДНК-сегменты позиционируют на конкретном участке хромосомы, формируя профиль гибридизации — количество ДНК-материала в каждом участке генома.

Микрочипы различаются по своей разрешающей способности. Чипы, использующие крупные сегменты ДНК (100—200 т.п.н.), встроенные в искусственные бактериальные хромосомы (BAC — bacterial artificial chromosome), применяются для aCGH низкого разрешения (low-resolution aCGH). В среднем они имеют разрешающую способность 1 млн п.н. (т.е. регистрируют избыток или потерю генетического материала размером 1 млн п.н., что примерно соответствует 0,1 хромосомного бэнда). Высоко-разрешающие микрочипы имеют разрешение 50—100 т.п.н., в них используют олигонуклеотидные последовательности длиной около 60 нуклеотидов, относительно равномерно покрывающие весь геном. Например, доступные коммерческие микрочипы на 105 000 или 244 000 олигонуклеотидов обеспечивают общее среднее покрытие генома с разрешением примерно 0,02 и 0,01 млн п.н. соответственно, т.е. в 500 и 1000 раз более информативны, чем кариотипирование.

Другой тип полногеномных микрочипов основан на однонуклеотидных полиморфизмах (SNP, single nucleotide polymorphism), широко представленных по всей протяжённости генома. Большинство SNP биаллельны, и такой анализ позволяет устанавливать как генотип, так и количество копий конкретной последовательности генома, включая однородительские дисомии и случаи потери гетерозиготности. Обе платформы пригодны для целей виртуального кариотипирования. Кроме того, конструируются специальные чипы для анализа конкретных регионов генома, например онкогенов, метилированных участков промоторов генов и т.д.

Технология aCGH пригодна для широкого исследования репродуктивных потерь и идентификации лежащих в их основе ранее не изученных генетических механизмов. Так как исследования проводятся на уровне ДНК, они не требуют наличия живых клеток и позволяют использовать ДНК из мацерированных тканей зародыша, непригодных для клеточных культур. Кроме того, для молекулярно-цитогенетического исследования становится доступным и архивный материал. Матричная сравнительная геномная гибридизация регистрирует большинство аномалий, обнаруживаемых у спонтанных абортусов, таких, как анеуплоидии и несбалансированные хромосомные перестройки.

Потенциальный недостаток этой технологии — неспособность выявлять сбалансированные структурные аномалии (реципрокные транслокации, инверсии и Робертсоновские транслокации). Также остаются невыявленными полиплоидии (три- и тетраплоидии), так как

количество ДНК в исследуемом образце выровнено по сравнению с референсной ДНК по всему геному. Учитывая, что в материале спонтанных абортусов полиплоидии представляют собой довольно часто встречающуюся аномалию (до 10–20% [18, 22, 35]), исследователями предлагаются различные способы выявления полиплоидных кариотипов. Один из них — комбинирование aCGH с другими методами, способными зарегистрировать присутствие дополнительного хромосомного набора. Это, например, интерфазный FISH-анализ некультивированных клеток с ДНК-зондами на X- и Y-хромосомы [27], количественная ПЦР [30], использование проточной цитометрии [21]. Другой подход представляет собой использование в качестве референсной ДНК выделенной из клеток с кариотипом 47,XXY [4]. С его применением сообщено о возможности диагностики различных анеуплоидий по половым хромосомам, триплоидии с кариотипом 69,XXY (но не 69,XXX), а также тетраплоидии 92,XXYY, гибридационный профиль которой, однако, совпадает с нормальным кариотипом эмбриона мужского пола, замаскированным наличием контаминации материнскими клетками [27].

Другая проблема этой технологии — недооценка хромосомного мозаицизма низкого уровня. Мозаичные анеуплоидии, по данным ряда исследований, являются довольно частым явлением в тканях спонтанно погибших эмбрионов [1, 20]. Определение чувствительности олигонуклеотидных микрочипов при анализе мозаичных форм анеуплоидии было проведено Скоттом с соавторами. Показано, что возможна детекция анеуплоидии (как трисомий, так и моносомий) по целым хромосомам при уровне мозаицизма 10%, а по участкам хромосом при уровне 20%. Однако для этого необходимы использование комбинированных данных прямого и повторного экспериментов с переменной флюорохромов (когда контрольная ДНК метится зелёным цветом, а опытная, наоборот, красным) и их анализ без использования фильтрации данных [30].

В обсуждаемом исследовании у эмбрионов с двойными трисомиями был обнаружен необычный для спонтанных абортусов тип мозаицизма. При сравнении виртуальных кариотипов, полученных при использовании ДНК из ворсин хориона, и результатов стандартного кариотипирования культивированных клеток, у пяти из 10 абортусов с двойными трисомиями в культуре, в некультивированных тканях была выявлена трисомия только по одной хромосоме (табл. 1). При этом во всех пяти случаях в некультивированных образцах присутствовали более распространённые у спонтанных абортусов трисомии и все результаты микрочипового анализа были подтверждены методом количественной ПЦР. Авторы полагают, что, так как ворсины хориона изначально состоят из клеток цитотрофобласта и мезенхимы, обнаруженное несоответствие является результатом ранее не выявленного плацентарного мозаицизма [30]. Интересно отметить, что из 20 абортусов с единичными трисомиями не было ни одного случая расхождения результатов анализа культивированных и некультивированных клеток.

Если ДНК для анализа на микрочипах была выделена из экстраэмбриональных тканей (плодного мешка, ворсин хориона), то часть образцов может содержать примесь ДНК материнского происхождения.

В работе Гао с соавторами 61 образец ДНК из ворсин хориона, продемонстрировавший аномалии кариотипа, был обследован на наличие материнской контаминации. Примесь ДНК матери была выявлена в семи образцах (11,5%). Доля материнской ДНК варьировала от 17 до 31%, и выявить её удалось путём снижения порога детекции флюоресцентного отношения до значения 1,2 по сравнению со стандартным значением 1,3 [17]. Однако авторы не приводят данных о способе дифференцировки между материнской контаминацией и внутри- или межтканевым мозаицизмом экстраэмбриональных тканей.

Таблица 1

Кариотипы культивированных и некультивированных клеток абортусов с двойными трисомиями, продемонстрировавшие расхождение результатов (по [30])

Молекулярное кариотипирование (aCGH) некультивированных ворсин хориона	Стандартный цитогенетический анализ культивированных клеток	Расхождение результатов анализа
arr 18(140933-76114593)x3	48,XX,+2,+18	+
arr 15(19109124-100208004)x3	48,XX,+5,+15	+
arr 18(140933-76114593)x3	48,XX,+7,+18	+
arr 21(10079061-46918226)x3	48,XX,+7,+21	+
arr 16(37133-88643347)x3	48,XY,+14,+16	+
arr 2(29193-242768117)x3, 15(19109124-100208004)x3	48,XX,+2,+15	
arr 3(49708-199328649)x3, 20(8747-62374318)x3	48,XX,+3,+20	
arr 7(136382-158624081)x3, 13(18650699-114112478)x3	48,XX,+7,+13,der(13;14)(q10;q10)	
arr 8(90816-146254382)x3, 9(195675-138301707)x3	48,XX,+8,+9	
arr 18(140933-76114593)x3, 22(14433473-49466331)x3	48,XX,+18,+22	

Считается общепринятым, что установленные при анализе микрочипов мутации необходимо верифицировать другими методами, чтобы исключить методическую погрешность. Обычно проверку проводят с помощью ПЦР в реальном времени (RT-PCR), количественной флюоресцентной ПЦР (QF-PCR), интерфазного или метафазного FISH-анализа.

Полиморфизм по числу копий крупных блоков повторов (CNV) при ранней эмбриональной гибели

Применение в последние годы высокоразрешающих методов анализа генома обнаружило у человека существование значительного уровня генетической вариабельности, которая включает в себя однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) и структурные вариации последовательностей ДНК с изменяющимся числом повторов (STR, VNTR, CNV), вставок/делеций, инверсий и транслокаций [9]. Под CNV (Copy Number Variation — вариацией числа копий крупных блоков повторов) понимается вид структурных вариаций генома, различающихся числом копий определённых регионов хромосом. Для обозначения такого вида изменчивости рекомендовано использовать термин *вариация*, поскольку, в отличие от полиморфизма, определяемого при частоте редкого аллеля в популяции не ниже 1%, для большинства CNV их популяционная частота пока неизвестна и может не превышать 1%. В связи с этим, для оценки значимости CNV в геноме человека в реализации нормальных и патологических процессов онтогенеза принципиальное значение приобретают исследования, направленные на оценку спектра и распространённости CNV на разных этапах индивидуального развития организма.

В большинстве случаев CNV стабильны и могут наследоваться. Кроме того, они могут возникать *de novo* в процессе мейоза, однако точный механизм образования вариаций числа повторов пока не совсем изучен. В Базе данных геномных вариантов к настоящему времени уже описано более 66 741 CNV, обнаруженных у здоровых индивидов (<http://projects.tcag.ca/variation/?source=hg19>). В зависимости от метода определения вариаций числа повторов (что зависит от плотности маркёров на исследовательских платформах микрочипов) они составляют до 12% от всего генома человека. Более 41% CNV перекрываются с известными генами и, следовательно, способны влиять на регуляцию генной экспрессии через эффект дозы или положения [12, 34]. Согласно классификации Gene Ontology (GO), гены, попавшие в регионы CNV, оказываются вовлечёнными, например, в иммунный ответ, метаболизм лекарств, ответы на внешние биогенные стимулы, нейрофизиологические процессы и развитие мозга [12, 15]. Пока неизвестно точное число генетических заболеваний, обусловленных CNV, однако очевидно, что их количество может быть значительным.

Проблемой современных биомедицинских исследований является интерпретация клинической значимости вариабельности числа повторов вследствие существ-

ования как нейтральных полиморфных, так и патогенных вариантов. CNV обнаруживаются как у здоровых индивидов, так и при различных патологиях. Они могут вызывать микроделеционные/микродупликационные синдромы, но могут быть и мелкими, клинически незначимыми полиморфизмами. При анализе данных матричной CGH с клиническими целями следует дифференцировать варианты: вероятно нейтральные, вероятно патогенные и с неизвестной клинической значимостью.

Принято считать, что на возможную патогенетическую значимость CNV оказывают влияние:

- унаследованность варианта от родителей-носителей или его возникновение *de novo*;
- отсутствие или наличие данного варианта у здоровых индивидов (уникальные или распространённые варианты);
- размер;
- делеция или дупликация;
- генное содержание CNV.

Так, если CNV обнаруживается и у пациента (или абортуса), и у его здорового родителя, она, вероятно, нейтральна, а возникшая *de novo*, скорее всего, отвечает за патологический фенотип. Однако необходимо отметить, что даже унаследованные варианты могут быть клинически значимыми. Кроме того, гомозиготный вариант числа повторов у потомка проявляется тяжелее, чем гетерозиготный у родителя. Гетерозиготный CNV потенциально может позволить проявиться рецессивным мутациям на другом гомологе. Также возможно, что проявление заболевания происходит при комбинации различных CNV и других генетических вариаций, таких, как SNP. Другой вариант фенотипической значимости унаследованного CNV возможен, если затрагиваемые им гены играют роль в стрессорном ответе и если эмбрион подвергался внутриутробному стрессу сильнее, чем его предок — носитель данного CNV. Наконец, унаследованный вариант CNV может затрагивать импринтированные гены, т.е. дифференциально экспрессирующиеся в зависимости от их родительского происхождения.

Недавно на микрочипах высокого разрешения были предприняты исследования родительского происхождения субмикроскопического хромосомного дисбаланса у погибших эмбрионов с нормальным кариотипом и обнаружено, что подавляющее большинство уникальных (ранее не зарегистрированных) CNV, выявленных у спонтанных абортусов, были унаследованы от кого-либо из родителей [25, 26]. Тем не менее, авторы полагают, что нельзя исключить негативное влияние этих CNV на развитие плаценты и/или эмбриона вследствие импринтинга, рецессивных мутаций на интактном гомологе и вариабельной экспрессии. Так, в одной семье у трёх погибших эмбрионов с аномалиями развития плаценты был выявлен унаследованный от матери CNV, прерывающий нуклеотидную последовательность гена *TIMP2* (тканевой ингибитор металлопротеиназ 2) [25]. В первом триместре беременности *TIMP2*, как полагают, экс-

прессуруется в плаценте с материнского гомолога и играет роль в регуляции инвазии трофобласта в эндометрий матери и ангиогенеза плаценты.

Обнаруженные новые варианты числа повторов необходимо сравнить с каталогом CNV, найденных у здоровых и у поражённых индивидов, чтобы решить, является ли выявленный дисбаланс потенциально патогенным. Существуют доступные базы данных по CNV сотен здоровых индивидов (база данных геномных вариантов, DGV — Database of Genomic Variants) (<http://projects.tcag.ca/variation>) и базы данных пациентов с различными патологиями (DECIPHER, ECARUCA, ISCA).

Пока не выработано однозначных критериев оценки распространённости и патогенетической значимости CNV в исследованиях невынашивания беременности. Так, в работе Райкан-Сепарович с соавторами CNV считались распространёнными, если они более чем на 50% своей длины перекрывались с CNV, обнаруженными у контрольных (здоровых) индивидов, по меньшей мере, в двух независимых исследованиях, внесённых в каталог DGV. Уникальными считали CNV, отсутствующие в DGV или частично (<50%) перекрывающиеся с контролем [25]. В исследовании Робберехт с соавторами к распространённым относили только варианты, полностью перекрывающиеся с уже зарегистрированными в упомянутой выше базе данных, остальные классифицировали как уникальные [28].

Выводы об уникальности и распространённости варианта повторов следует делать с большой осторожностью, так как не все CNV в базах верифицированы и часто выявлены при обследовании небольших по размеру выборок индивидов. И даже если обнаруженный CNV отсутствует в базе данных здоровых индивидов, нельзя с абсолютной уверенностью утверждать, что именно он является причиной патологического фенотипа или гибели эмбриона.

Считается общепринятым, что варианты большего размера и/или содержащие гены, бывают чаще связаны с патологией, чем мелкие CNV, не затрагивающие кодирующие участки генома, и что делеции чаще клинически значимы, чем дубликации. Тем не менее, в геноме здоровых индивидов выявляются крупные CNV (5—5000 т.п.н.), причём многие из них содержат гены. Так, Конрад с соавторами обнаружили 92 полных и 109 частичных делеций генов у здоровых людей [10]. Существует потенциальная возможность, что CNV связаны с изменениями в функции гена и патологическим процессом, даже если они находятся вне гена. Например, если они расположены вне кодирующей последовательности, то могут затрагивать функцию гена путём изменения его стабильности, сплайсинга или локализации мРНК [8].

Возникает, однако, вопрос, раз такие значительные генные вариации генома фенотипически толерантны, то почему в процессе эволюции человека часть генов не была утрачена и почему не появился избыток копий генов в других регионах? Возможно, существует естественный

отбор против неблагоприятного числа копий фрагментов генома и проявляться он может вероятнее всего на ранних стадиях эмбрионального развития, затрагивая:

- 1) микроделеции и микродупликации *de novo*;
- 2) неблагоприятное число копий CNV.

Поэтому высокоразрешающие полногеномные исследования генетических вариантов у погибших эмбрионов представляют интерес не только с точки зрения анализа причин невынашивания беременности, но и для понимания эволюции генома человека.

Большинство первых работ по изучению спонтанных абортусов с помощью aCGH проводилось на низкоразрешающих платформах ВАС-чипов: специфических регионов генома [29] или полногеномных матриц [6, 21, 27, 32]. Тем не менее, данные исследования показали, что aCGH обнаруживает крупные хромосомные аномалии у 57% абортусов, клетки которых не способны к нормальной пролиферации в культуре [6], что мозаичные формы хромосомных аномалий выявляются у 10—30% абортусов [27, 29]. Вариации числа крупных блоков повторов были выявлены у 5% абортусов с нормальным кариотипом [32] (табл. 2). Позднее применение aCGH позволило документировать субмикроскопические аномалии у 13% эмбрионов с нормальным кариотипом [36].

Так как для установления патологической значимости обнаруженных CNV необходимо знать локализацию точек разрыва, их генное содержание и статус наследования, необходимы широкомасштабные исследования мелких структурных вариаций генома у спонтанных абортусов и их родителей. Пока известны лишь единичные работы, выполненные с применением этих методов, и выборки обследованных зародышей были невелики. Полногеномный анализ микроструктурных хромосомных перестроек у 17 кариотипически нормальных эмбрионов с множественными пороками и внутриутробной задержкой развития (анэмбриония, неразвивающаяся беременность), проведённый Райкан-Сепарович с коллегами, не обнаружил ни одного крупного (>1 млн п.н.) уникального CNV, однако высокоразрешающий aCGH выявил 6 мелких ранее неизвестных CNV (<250 т.п.н.) у пяти из 10 проанализированных эуплоидных эмбрионов [26]. В этих регионах оказались локализованы гены, которые можно рассматривать в качестве кандидатных для нарушений эмбрионального развития: *GPR180*, *WDR37*, *WDR16*, *STX8*, *NSDH2*, *PTHBI* (табл. 3). Наибольший интерес вызывают гены, принадлежащие к одному семейству, например *SYNTAXIN* и *WDR*, мутации в которых показаны более чем у одного зародыша. В другом исследовании той же группы авторов 11 ранее не описанных CNV было обнаружено у 13 зародышей, полученных от восьми пар с привычным невынашиванием беременности, и все CNV были унаследованы от кого-либо из родителей [25].

Таблица 2

Субмикроскопические аномалии, выявленные с помощью aCGH в выборках спонтанных абортусов

Источник	Выборка			Микроматрица, производитель*	Субмикроскопические аномалии	
	n	Особенности	Срок беременности, нед.		Регион	Число (%)
Schaeffer et al., 2004 [29]	41	—	До 20	BAC, GenoSensor Array 300	del9p21, dup15q11-q13, dup10qtel	3 (7%)
Benkhalifa et al., 2005 [6]	26	С низкой пролиферативной активностью в культуре	9–11	BAC, Spectral Genomics, 2600 клонов, 1Mb	del22q13, dup1pter	2 (8%)
Shimokawa et al., 2006 [32])	20	С нормальным кариотипом	5–12	BAC, 2173 клонов	del3p26.2-p26.3 (1,4 Mb)	1 (5%)
Borovic et al., 2008 [7]	17	С нормальным кариотипом	—	BAC, 1 Mb, 3500 клонов	—	0
Robberecht et al., 2009 [27]	103	—	—	BAC, 3534 клонов	delXp22.3 (787,5 kb)	1 (1%)
Warren et al., 2009 [37]	30	С нормальным кариотипом или с низкой пролиферативной активностью в культуре	10–20	BAC, Spectral, 2600 клонов, 1 Mb	dupXp22.31 (RP11-294K6) — у двух эмбрионов, del13q33.3 (RP11-381O6), dup5pter (RP1-84C11)	4 (13%)
	6	С вариантами de novo, выявленными на BAC-чипе		Олигонуклеотидный Agilent, 244K	dupXp22.31 (289 kb) — у двух эмбрионов, del13q33.3 (115 kb) , dup5p15.33 (93 kb)	
Menten et al., 2009 [21]	100	Абортусы от женщин с ПНБ или старше 36 лет	I–III триместры	BAC, 1 Mb	del7q36-qter, delXq28qter, dup13q31.1-qter, del20p12.1-pter	3 (3%)
Zhang et al, 2009 [36]	58	С нормальным кариотипом или с низкой пролиферативной активностью в культуре	I триместр	Олигонуклеотидный, Agilent, 244K	del9p21.2 (108kb), dup2p12 (1,46 Mb), dup9q22.33 (300 kb), dup19p11.2 (631 kb), dup18p11.31 (502 kb)	5 (9%)
Desphande et al., 2010 [11]	20	—	—	BAC, Focus Cytoship, 100 kb — 1 Mb	—	0
Rajcan-Separovic et al., 2010 [26]	17	С нормальным кариотипом и дефектами развития	—	BAC, Spectral Genomics, 1 Mb; олигонуклеотидный, Agilent, 105K	dup10p15.3 (198.86 kb) ** , dup17p13.1 (208,57 kb), del1q25.3 (48,9 kb), dupXq28 (171 kb), dup13q32.1 (12,87 kb) , del7p14.3 (152,59 kb)	5 (29%)
Rajcan-Separovic et al., 2010 [25]	27	Абортусы с нормальным кариотипом от пар с ПНБ	—	Олигонуклеотидный, Agilent, 105K	11 уникальных CNV, все унаследованы	15*** (55,5%)
Robberecht et al., 2012 [28]	32	Абортусы от пар с ПНБ	4–11	BAC, 1Mb; олигонуклеотидный CytoSure, OGT, 15K;	17 распространённых, представленных в DGV, 11 уникальных CNV, dup11p11.2 (958 kb) , dup11p15.4 (12,8 kb)	6/11 (55%)
	11	Абортусы с нормальным результатом на низко разрешающих чипах		HumanCytoSNP-12.2, Illumina		
Gao et al., 2012 [17]	100	—	До 12	Олигонуклеотидный, Agilent, 8x60 K, 50 kb	del7p21.3-p22.3 (11,72 Mb)	1 (1%)
Итого	596					0 — 55%

Примечание. ПНБ — привычное невынашивание беременности. **Жирным шрифтом** выделены варианты, возникшие *de novo*, если было исследовано родительское происхождение CNV. * — структура и дизайн чипов, производитель которых не указан, являются авторскими; ** — приведены только уникальные CNV (не перекрывающиеся с зарегистрированными у здоровых индивидов); *** — несколько абортусов в одной семье, унаследовавших один вариант CNV.

Участки генома, вероятно, связанные с невынашиванием беременности, по результатам анализа микрочипов

Локус (мутация, размер)	Ген	Функция	Ссылка
3p26.2-p26.3 (del 1,4Mb)	CNTN4	Развитие нервной системы, Зр-делеционный синдром	[32]
	<i>IL5RA</i>	Рецептор интерлейкина 5	
	<i>TRNT1</i>	Участие в функционировании тРНК	
	CRBN	Регуляция комплексирования нейронов	
Xp22.31 (dup 289 kb),	Нет генов	—	[37]
13q33.3 (del 115 kb),	<i>FAM155A</i>	Неизвестна	
5p15.33 (dup 93 kb)	ZDHHC11	Белок цинковых пальцев	
10p15.3 (dup198,86 kb)	<i>GTPBP4</i>	Биогенез рибосом	[26]
	IDI1	Вовлечён в патогенез болезней пероксисом	
	IDI2	Экспрессируется в скелетной мускулатуре	
17p13.1 (dup 208,57 kb)	<i>WDR16</i>	Полярность клетки и управление молекулярным гомеостазом внутримозговой жидкости	
	<i>STX8</i>	Внутриклеточный транспорт белков	
	<i>USP43</i>	Активность убиквитинтиолэстеразы	
1q25.3 (del 48,9 kb)	<i>STX6</i>	Эндосомная организация, клеточная адгезия, внутриклеточный транспорт	
	<i>KIAA1614</i>	Неизвестна	
Xq28 (dup171 kb)	<i>CETN2</i>	Субъединица ядерных пор, транспорт мРНК и белков	
	<i>NSDHL</i>	Биосинтез холестерина;	
	ZNF185	Онкосупрессор	
13q32.1 (dup 12,87 kb)	<i>GPR180</i>	Ремоделирование сосудов	
7p14.3 (del 152,59 kb)	PTHB1	Синдром Барде—Бидля и преждевременная недостаточность яичников	
6q26 (del 145 kb)	PARK2	Нейромедиатор, возможно — опухолевый супрессор	[25]
16q23.1 (del 155 kb)	<i>CNTNAP4</i> в 30 kb от CNV	Контактин-связанный белок	
5q12.1 (del 58 kb)	<i>NDUFA12L</i>	Митохондриальный белок	
17q25.3 (dup 86 kb)	TIMP2	Тканевой ингибитор металлопротеиназ, активно экспрессируется в плаценте	
15q22.1 (del 76 kb)	<i>LIPC</i>	Ген липазы печени	
10q21.3 (del 72 kb)	CTNNA3	Межклеточная адгезия, импринтирован в плаценте	
Xp22.2 (dup330 kb)	<i>GMP6B</i>	Гликопротеин, обнаруживается в сыворотке на ранней стадии рака яичников	
	<i>RAB9A</i>	Ген семейства Ras-онкогенов	
	<i>TRPPC2</i>	Ген не представлен в базе данных NCBI*	
	OFD1	Компонент центриолей, регулятор Wnt-сигнального пути	
	EGFL6	EGF-подобный белок со значительной экспрессией в плаценте	
5q23.3 (del 53 kb)	<i>CSS3</i>	Хондроитинсульфатсинтаза	
11p15.1 (dup117 kb)	<i>PRMT3</i>	Метилирование белков	
7p14.1 (dup177 kb)	RALA	Белок семейства Ras	
	<i>POU6F</i>	Ген не представлен в базе данных NCBI*	
	<i>C7orf36</i>	Неизвестна	
Xp22.31 (dup1593 kb)	<i>HDHD1A,</i>	Утилизация продуктов распада рРНК	
	STS	Конвертирует стероидный предшественник в эстроген во время беременности	
	<i>PNPLA4</i>	Фосфолипаза	
	<i>VCX</i>	Экспрессируется в мужских половых клетках	
14q13.1 (del 27 kb)	NPAS3	Нейрональный PAS белок	
19q13.41 (dup 482 kb)	Большинство генов цинковых пальцев		

Таблица 3 (окончание)

11p11.12 (dup 958 kb)	Нет генов	—	[28]
11p15.4 (dup 12,8 kb)	CDKN1C	Импринтированный ген, ингибитор комплекса G1циклин/Cdk, регулятор клеточной пролиферации	
Примечание. * — База данных "Gene" (NCBI) — http://www.ncbi.nlm.nih.gov . Жирным шрифтом выделены гены с известной патогенетической значимостью.			

Наследование CNV, затрагивающих регионы с импринтированными генами, необходимыми для развития зародыша и функционирования плаценты (CNV в сочетании с мутацией во втором аллеле), и генами с вариативной экспрессивностью, может приводить к повторному нарушению и остановке эмбрионального развития в ходе следующей беременности. Авторы выделили общие для нескольких зародышей CNV как потенциальные факторы риска нарушения эмбрионального развития — dupXp22.2 (ген *EGFL6*), dupXp22.31 (ген *STS*), del10q21.3 (ген *CTNNA3*) и dup17q25.3 (ген *TIMP2*). Гены *TIMP2* и *CTNNA3* являются ингибиторами инвазии трофобласта. Показано, что *CTNNA3* в первом триместре беременности экспрессируются в плаценте только с материнского аллеля, т.е. подвержен импринтингу. Ранее не сообщалось о связи *TIMP2* и привычного невынашивания беременности у человека, однако его сверхэкспрессия была выявлена у модельных мышей с привычным невынашиванием. Гены, локализованные на X-хромосоме (*EGFL6* и *STS*), демонстрируют интенсивную экспрессию в плаценте при нормальной беременности. Они играют роль в женской репродуктивной системе во время беременности, влияя на восприимчивость матки и на продукцию эстрогена.

Уоррен с соавторами проанализировали 30 абортусов с нормальным кариотипом или не прокариотипированных вследствие низкой пролиферативной активности клеток в культуре, а также их родителей с помощью высокоразрешающей aCGH. Всего подтверждено 4 случая возникших *de novo* CNV, причём два из них были локализованы в сайте Xp22.31 [37]. В обоих случаях мутация представляла собой дубликацию размером 289 т.п.н. и не содержала генов, однако очень интересно, что Райкан-Сепарович с соавторами обнаружили унаследованную дубликацию размером 1593 т.п.н., затрагивающую несколько генов, в том числе и ген *STS*, в этом же регионе Xp22.31. В работе Уоррена с коллегами среди унаследованных CNV, отсутствующих в базе данных здоровых индивидов, привлекают внимание также вариации, повторяющиеся у нескольких погибших эмбрионов. Так, у четырёх из шести абортусов встречаются вариации в локусе 1p36.11, содержащем ген *RHD*, связанный с клеточным транспортом натрия. Другой общий для четырёх эмбрионов вариант картирован в регионе 6p21.32, ассоциированном с прогрессией рассеянного склероза. Еще один интересный регион — 17q25.3 (локус, содержащий последовательность гена, ортологичную гену *MafG*, связанному с

тяжёлыми аномалиями кроветворения и перинатальной летальностью у модельных мышей) — встретился у двух эмбрионов.

Выполненная на полногеномной SNP-платформе работа Робберхт с соавторами выявила распространённые CNV в восьми из 11 обследованных случаев эмбриональной гибели, а у шести эмбрионов — 11 уникальных CNV, причём 2 из них — возникшие *de novo*. Размеры CNV варьировали в пределах от 3 т.п.н. до почти 1 млн п.н. У одного эмбриона дубликация *de novo* в регионе 11p11.12 находилась в области сателлитных повторов между генами обонятельных рецепторов и не содержала генов. У другого абортуса вновь возникшая мутация содержала ген *CDKN1C* — ингибитор некоторых комплексов G1циклин/Cdk, негативный регулятор клеточной пролиферации, локализованный в импринтированном регионе. Кроме того, авторы обнаружили копияно-нейтральные потери гетерозиготности (loss of heterozygosity, LOH) в трёх случаях из шести, что заставляет предположить существование связи между рецессивными мутациями и привычным (более трёх случаев в анамнезе) невынашиванием беременности [28].

Заключение

Завершая обзор исследований спонтанных абортусов, проведённых методом aCGH, нужно отметить, что данная технология позволяет выявлять ранее не изученные варианты генома, ассоциированные с невынашиванием беременности. Пока такие исследования только начались, но их продолжение обещает возможность картирования генов или участков генома, критичных для процессов репродукции, с целью дальнейшего проведения преимплантационной диагностики в семьях с привычным невынашиванием беременности. В исследовании причин эмбриональной гибели необходимо включать также родителей и не только для того, чтобы выявить наследование обнаруженных у абортусов CNV, но и потому, что, возможно, сами матери являются носителями уникальных вариантов, содержащих гены, вовлечённые в развитие эмбрионов, рост плаценты и гормональное, иммунологическое и васкулярное взаимодействие между матерью и эмбрионом. Для изучения их и для определения, является ли унаследованный CNV или неблагоприятное число копий частых CNV возможной причиной невынашивания, необходимы широко-масштабные полногеномные обследования генотипов абортусов и их родителей.

Список литературы

1. Ворсанова С.Г., Юров И.Ю., Колотий А.Д., Берешева А.К., Демидова И.А., Куринная О.С., Кравец В.С., Монахов В.В., Соловьев И.В., Юров Ю.Б. Хромосомный мозаицизм в материале спонтанных абортос: интерфазный молекулярно-цитогенетический анализ 650 случаев // Генетика. — 2010. — Т. 46, №10. — С. 1356—1359.
2. Лебедев И.Н., Островерхова Н.В., Никитина Т.В., Суханова Н.Н., Назаренко С.А. Молекулярно-цитогенетическая характеристика хромосомного дисбаланса в клетках спонтанных абортосов с низкой пролиферативной активностью *in vitro* // Генетика. — 2003. — Т. 39, №8. — С. 1112—1122.
3. Суханова Н.Н., Лебедев И.Н., Никитина Т.В., Саженова Е.А., Назаренко С.А. Структура хромосомных нарушений у 552 спонтанных абортосов Томской популяции // Медицинская генетика. — 2002. — Т. 1, №6. — С. 271—276.
4. Ballif B.C., Kashork C.D., Saleki R., Rorem E., Sundin K., Bejjani B.A., Shaffer L.G. Detecting sex chromosome anomalies and common triploidies in products of conception by array-based comparative genomic hybridization // Prenat. Diagn. — 2006. — Vol. 26. — P. 333—339.
5. Bell K.A., Van Deerlin P.G., Haddad B.R., Feinberg R.F. Cytogenetic diagnosis of «normal 46,XX» karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading // Fertil. Steril. — 1999. — Vol. 71. — P. 334—341.
6. Benkhalifa M., Kasakyan S., Clement P., Baldi M., Tachdjian G., Demirolo A., Gurgan T., Fiorentino F., Mohammed M., Qumsiyeh M.B. Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro // Prenat. Diagn. — 2005. — Vol. 25. — P. 894—900.
7. Borovic C.L., Perez A.B., da Silva L.R.J., Krepschi-Santos A.C.V., Costa S.S., Rosenberg C. Array-CGH testing in spontaneous abortions with normal karyotypes // Genet. Mol. Biol. — 2008. — Vol. 31, №2. — P. 416—422.
8. Cartegni L., Chew S.L., Krainer A.R. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing // Nat. Rev. Genet. — 2002. — Vol. 3, №4. — P. 285—298.
9. Ceulemans S., van der Ven K., Del-Favero J. Targeted screening and validation of copy number variations // Methods Mol. Biol. — 2012. — Vol. 838. — P. 311—328.
10. Conrad D.F., Andrews T.D., Carter N.P., Hurles M.E., Pritchard J.K. Articles Legal documents
11. include patentsinclude citations
12. Advanced searchCreate alert
13. My Citations
14. Settings
15. A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome // Nat. Genet. — 2006. — Vol. 38, №1. — P. 75—81.
11. Desphande M., Harper J., Holloway M., Palmer R., Wang R. Evaluation of array comparative genomic hybridization for genetic analysis of chorionic villus sampling from pregnancy loss in comparison to karyotyping and multiplex ligation-dependent probe amplification // Genet. Test. Mol. Biomarkers. — 2010. — Vol. 14, №3. — P. 421—424.
12. de Smith A.J., Walters R.G., Froguel P., Blakemore A.I. Human genes involved in copy number variation: mechanisms of origin, functional effects and implications for disease // Cytogenet. Genome Res. — 2008. — Vol. 123. — P. 17—26.
13. Diego-Alvarez M., de Alba R., Cardero-Merlo R., Diaz-Recarens J., Ayuso C., Ramos C., Lorda-sanchez I. MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. // Prenat. Diagn. — 2007. — Vol. 27. — P. 765—771.
14. Eiben B., Bartels I., Bahr-Porsch S., Borgmann S., Gatz G., Gellert G., Goebel R., Hammans W., Hentemann M., Osmers R. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage // Am. J. Hum. Genet. — 1990. — Vol. 47. — P. 656—663.
15. Feuk L., Carson A.R., Scherer S.W. Structural variation in the human genome // Nat. Rev. Genet. — 2006. — Vol. 7, №2. — P. 85—97.
16. Fritz B., Hallermann C., Olert J., Fuchs B., Bruns M., Aslan M., Schmidt S., Coerdts W., Muntefering H., Rehder H. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridization (CGH)—Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. // Eur. J. Hum. Genet. — 2001. — Vol. 9. — P. 539—547.
17. Gao J., Liu C., Yao F., Hao N., Zhou J., Zhou Q., Zhang L., Liu X., Bian X., Liu J. Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion // Mol. Cytogenet. — 2012. — Vol. 16, №5. doi: 10.1186/1755-8166-5-33.
18. Goddijn M., Leschot N.J. Genetic aspects of miscarriage // Baillieres Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. — 2000. — Vol. 14. — P. 855—865.
19. Jobanputra V., Esteves C., Sobrino A., Brown S., Kline J., Warburton D. Using FISH to increase the yield and accuracy of karyotypes from spontaneous abortion specimens // Prenat. Diagnosis. — 2011. — Vol. 31. — P. 755—759.
20. Lebedev I.N. Mosaic aneuploidy in early fetal loss // Cytogenet. Genome Research. — 2011. — Vol. 133, №2—4. — P. 169—183.
21. Menten B., Swerts K., Delle Chiaie B., Janssens S., Buysse K., Phillippe J., Speleman F. Array comparative genomic hybridization and flow cytometry analysis of spontaneous abortions and mors in utero samples // BMC Med. Genet. — 2009. — Vol. 14. — P. 89—93.
22. Menasha J., Llevy B., Hirschhorn K., Kardon N.B. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from 12-year study // Genetics in Medicine. — 2005. — Vol. 7, №4. — P. 251—263.
23. Nikitina T.V., Lebedev I.N., Sukhanova N.N., Sazhenova E.A., Nazarenko S.A. A mathematical model for evaluation of maternal cell contamination in cultured cells from spontaneous abortions: significance for cytogenetic analysis of prenatal selection factors // Fertility Sterility. — 2005. — Vol. 83, №4. — P. 964—972.
24. Rai R., Regan L. Recurrent miscarriage // Lancet. — 2006. — Vol. 368. — P. 601—611.
25. Rajcan-Separovic E., Diego-alvarez D., Robinson W.P., Tyson C., Qiao Y., Harvard C., Fawcett C., Kalousek D., Philipp T., Somerville M.J., Stephenson M.D. Identification of copy number variants in miscarriage from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss // Hum. Reprod. — 2010. — Vol. 25. — P. 2913—2922.
26. Raican-Separovic E., Qiao Y., Tyson C., Harvard C., Fawcett C., Kalousek D., Stephenson M., Philipp T. Genomic changes detected by array CGH in human embryos with developmental defects // Mol. Hum. Reprod. — 2010. — Vol. 16. — P. 125—134.
27. Robberecht C., Schuddincx V., Fryns J.P., Vermeesch J.R. Diagnosis of miscarriages by molecular karyotyping: benefits and pitfalls // Genet. Med. — 2009. — Vol. 11. — P. 646—654.
28. Robberecht C., Pexsters A., Deprest J., Fryns J.P., D'Hooghe T., Vermeesch J.R. Cytogenetic and morphological analysis of early products of conception following hystero-embryoscopy from couples with recurrent pregnancy loss // Prenat. Diagn. — 2012. — Vol. 4. — P. 1-10. doi: 10.1002/pd.3936.
29. Schaeffer A.J., Chung J., Heretis K., Wong A., Ledbetter D.H., Lese M.C. Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic im-

balances in spontaneous miscarriages // *Am. J. Hum. Genet.* — 2004. — Vol. 74. — P. 1168–1174.

30. Scott S.A., Cohen N., Brandt T., Toruner G., Desnick R.J., Edelmann L. Detection of low-level mosaicism and placental mosaicism by oligonucleotide array comparative genomic hybridization // *Genet. Med.* — 2010. — Vol. 12, №2. — P. 85–92.

31. Shearer B.M., Thorland E.C., Carlson A.W., Jalal S.M., Ketterling R.P. Reflex fluorescent in situ hybridization testing for unsuccessful product of conception cultures: a retrospective analysis of 5555 samples attempted by conventional cytogenetics and fluorescent in situ hybridization // *Genet. Med.* — 2011. — Vol. 13. — P. 545–552.

32. Shimokawa O., Harada N., Miyake N., Satoh K., Mizuguchi T., Niikawa N., Matsumoto N. Array comparative genomic hybridization analysis in first-trimester spontaneous abortions with «normal» karyotypes // *Am. J. Med. Genet.* — 2006. — Vol. 140. — P. 1931–1935.

33. Solinas-Toldo S., Lampel S., Stilgenbauer S., Nickolenko J., Benner A., Dohner H., Cremer T., Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: Biochips to screen for genomic imba-

lances // *Genes, Chromosomes and Cancer.* — 1997. — Vol. 20, №4. — P. 399–407.

34. Stranger B.E., Forrest M.S., Dunning M., Ingle C.E., Beazley C., Thorne N., Redon R., Bird C.P., de Grassi A., Lee C., Tyler-Smith C., Carter N., Scherer S.W., Tavares S., Deloukas P., Hurles M.E., Dermitzakis E.T. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes // *Science.* — 2007. — Vol. 315. — P. 848–853.

35. van den Berg M.M., van Maarle M.C., van Wely M., Goddijn M. Genetics of early miscarriage // *Biochim Biophys Acta.* — 2012. — doi:10.1016/j.bbdis.2012.07.001.

36. Zhang Y.X., Zhang Y.P., Gu Y., Guan F.J., Li S.L., Xie J.S., Shen Y., Wu B.L., Ju W., Jenkins E.C., Brown W.T., Zhong N. Genetic analysis of first-trimester miscarriages with a combination of cytogenetic karyotyping, microsatellite genotyping and array CGH // *Clin. Genet.* — 2009. — Vol. 75. — P. 133–140.

37. Warren J.E., Turok D.K., Maxwell T.M., Brothman A.R., Silver R.M. Array comparative genomic hybridization for genetic evaluation of fetal loss between 10 and 20 weeks of gestation // *Obstet. Gynecol.* — 2009. — Vol. 114. — P. 1093–1102.

Molecular karyotyping (aCGH) as modern approach for investigations of miscarriage causes

Nikitina T.V.¹, Kashevarova A.A.¹, Skryabin N.A.¹,
Chechetkina N.N.¹, Melnikov A.A.², Lebedev I.N.¹

¹ — Scientific Research Institute of medical genetics,

Tomsk, Ushaika street, 10; fax +7(3822) 51-37-44, e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru

² — Scientific Research Institute of oncology, Tomsk, Kooperativniy street, 5. fax +7(3822) 51-40-97

15–20% of recognized pregnancies are lost as spontaneous abortions during first trimester, and about half of them are caused by fetal chromosome abnormalities. Identification of these abnormalities helps to estimate recurrence risks in future pregnancies. However, due to cell culture failures, maternal cell contamination and submicroscopic rearrangements often no fetal karyotype can be obtained. Array-based comparative genomic hybridization (aCGH) can overcome some of these limitations and ascertain fetal karyotype with high resolution. In addition, this approach permits to investigate copy number variations (CNV) with purpose to search for variants associated with reproductive wastage. This approach permits also ascertainment of genes crucial for embryonic development.

Key words: miscarriage, spontaneous abortions, array-based comparative genomic hybridization (aCGH), copy number variations (CNV)