Возрастзависимый тканеспецифичный гоносомный мозаицизм у фертильных женщин репродуктивного возраста

Тарлычева А.А.¹, Маркова Ж.Г.¹, Волкова Т.Б.², Шилова Н.В.¹

1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»,
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

2 — ООО Клиника «Семья»,
143969, Московская обл, г. Реутов, Юбилейный проспект, д. 33

Для установления уровня тканеспецифичного гоносомного мозаицизма у здоровых женщин репродуктивного возраста проведено молекулярно-цитогенетическое исследование культивированных лимфоцитов периферической венозной крови (КЛ), некультивированных лимфоцитов периферической венозной крови (НКЛ) и клеток Buccal epithelium (БЭ). Установлено, что в КЛ присутствует низкоуровневый гоносомный мозаицизм с тенденцией к повышению частоты клеток с X-анеупloidией с увеличением возраста женщины. Средняя частота клеток с моносомией и трисомией по X хромосоме составляет соответственно 1,83% и 0,66% в группе женщин в возрасте 20-29 лет; 2,23% и 0,86% — в возрасте 30-39 лет и 5,88% и 1,95% — в возрасте 40-49 лет. Средняя частота анеупloidных клеток в НКЛ статистически значимо не отличалась от таковой в КЛ. В БЭ средняя частота мозаичной X-анеупloidии во всех возрастных группах составляет 4,01%. Таким образом, нами определён уровень гоносомного мозаицизма в лимфоцитах и БЭ здоровых фертильных женщин и разработан протокол обследования пациентов при обнаружении низкоуровневого мозаицизма по хромосоме X.

Ключевые слова: анеупloidия, мозаицизм, X-хромосома, флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH)

Для цитирования: Тарлычева А.А., Маркова Ж.Г., Волкова Т.Б., Шилова Н.В. Возраст-зависимый тканеспецифичный гоносомный мозаицизм у фертильных женщин репродуктивного возраста. *Медицинская генетика* 2019; 18(2):35-41
DOI: 10.25557/2073-7998.2019.02.35-41

Автор для корреспонденции: Тарлычева Анастасия Александровна, **e-mail:** atarlycheva@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 14.01.2019

Age-dependent gonosomal mosaicism in fertile women of reproductive age

Tarlycheva A.A.¹, Markova Zh.G.¹, Volkova T.B.², Shilova N.V.¹

1 — Research Centre for Medical Genetics,
Moscow, Russian Federation, 115522, Moskvorechie st. 1

2 — «Semja» Clinic,
143969, Reutov, Jubileiny av, 33

The aim of study was to evaluate X-chromosome mosaicism in health fertile women from different age groups. We found physiological low-level gonosomal mosaicism in peripheral blood lymphocytes with a clear trend in increased proportion of X-aneuploidic cells associated with the increasing age to 1.83%, 2.23% and 5.88% for 20—29, 30—39 and 40—49 years, respectively. The buccal smear also exhibited physiological pattern of a low-level X-chromosome mosaicism, however, the level of gonosomal mosaicism with no statistically significant difference between groups, average level was 4.01%. The obtained data allow to developed diagnostic protocol of low-level X-chromosome mosaicism in fertile women.

Key words: aneuploidy, mosaicism, X-chromosome, fluorescence *in situ* hybridization

For citation: Tarlycheva A.A., Markova Zh.G., Volkova T.B., Shilova N.V. Age-dependent gonosomal mosaicism in fertile women of reproductive age. *Medinskaya genetika [Medical genetics]* 2019; 18(2): 35-41 (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.02.35-41

Corresponding author. Tarlycheva Anastasya; **e-mail:** atarlycheva@yandex.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 14.01.2019

Введение

В индустриально развитых странах 15—20% супружеских пар имеют репродуктивные проблемы, такие как бесплодие или привычное невынашивание беременности, поэтому исследование этиологии таких состояний крайне важно [1]. Одной из возможных причин репродуктивных проблем являются хромосомные аномалии у одного из супругов, например, сбалансированные структурные хромосомные перестройки или гоносомный мозаицизм [2, 3, 4]. Хромосомный аутосомный мозаицизм, как правило, сопряжен с аномальным фенотипом [5, 6], в то время как мозаицизм по хромосоме X может выявляться не только у пациентов с врожденными аномалиями развития, но и у здоровых индивидуумов. Установлено, что гоносомный мозаицизм, при котором аномальный клон с X-анеупloidией составляет менее 10%, может встречаться у фенотипически нормальных женщин, при этом доля мозаичного клона увеличивается с возрастом [7, 8].

Выявление, идентификация и интерпретация мозаичного кариотипа, в частности, мозаицизма по половым хромосомам — одна из проблем диагностики хромосомных аномалий [1]. В клинической практике наиболее распространен цитогенетический анализ препаратов из культивированных лимфоцитов (КЛ) периферической крови, подразумевающий оценку хромосомного статуса пациента путём анализа ограниченного количества метафазных пластинок. Соотношение клонов клеток с нормальным и аномальным кариотипом может быть различным, поэтому диагностика мозаицизма при стандартном цитогенетическом исследовании препаратов КЛ периферической крови затруднительна, особенно если частота клеток с анеупloidией менее 10%, т.е. мозаицизм является низкоуровневым [1, 7]. Цитогенетики часто сталкиваются с проблемой интерпретации результатов анализа при обнаружении одной или нескольких метафазных пластинок с аномальным количеством половых хромосом у фенотипически нормальных женщин, которым цитогенетическое обследование проводится по поводу бесплодия или привычного невынашивания беременности. Не всегда можно определить, является ли обнаруженный мозаицизм клинически значимым, или физиологическим, связанным с возрастом женщины.

В последнее время в клинической цитогенетике широкое распространение получили молекулярно-цитогенетические методы, в частности, флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH). В отличие от стандартного цитогенетического исследования, FISH позволяет проанализировать гораздо большее количество (1000 и бо-

лее) клеток при значительном сокращении времени исследования. Кроме того, этот метод позволяет проводить анализ не только метафазных пластинок, в которых возможна артефактная потеря хромосом, но и интерфазных ядер, что позволяет исследовать препараты из некультивированных клеток различных тканей [6].

В статье представлены результаты оценки уровня возраст-зависимого, тканеспецифичного, мозаицизма по X хромосоме в лимфоцитах периферической крови и клетках буккального эпителия у фенотипически нормальных женщин репродуктивного возраста и протокол обследования пациентов при обнаружении низкоуровневой X-анеупloidии.

Материалы и методы

С целью определения уровня возраст-зависимого, тканеспецифичного мозаицизма по хромосоме X молекулярно-цитогенетическое исследование проведено 66 женщинам репродуктивного возраста (20—49 лет) без фенотипических аномалий, имеющим здоровых детей. Материалом для исследования являлись образцы клеток буккального эпителия (БЭ) и периферической венозной крови от 34 и 32 здоровых женщин соответственно. Из каждого образца периферической крови готовили препараты КЛ и некультивированных лимфоцитов (НКЛ).

От всех пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании.

Препараты КЛ, НКЛ и клеток БЭ готовили в соответствии со стандартными протоколами [9, 10].

FISH проводили с ДНК-зондами на прицентроммерные районы хромосом X (p11.1-q11.1, DXZ1) и 18 (p11.1-q11.1, D18Z1) (Kreatech, Нидерланды).

Денатурацию и гибридизацию выполняли с использованием гибридизационной системы «ThermoBrite» (StatSpin, США) согласно протоколам фирмы-производителя. Анализ осуществляли на эпифлуоресцентном микроскопе «AxioImager M.1» (Carl Zeiss, Германия) с соответствующим набором светофильтров и использованием компьютерной программы обработки цифровых изображений «Isis» (MetaSystems, Германия).

В каждом случае анализировали не менее 150 интерфазных ядер. Всего было проанализировано 13 483 интерфазных ядра.

Полученные данные обрабатывали в программе STATISTICA 6.1.478 (StatSoft, США), и Excel из пакета программ Microsoft Office 2007 (Microsoft Corp., США).

Результаты

В зависимости от возраста сформированы три группы женщин: 1 группа — 20—29 лет (n=22), 2 груп-

па — 30—39 лет ($n=25$), 3 группа — 40—49 лет ($n=19$). Результаты анализа гоносомного мозаицизма, выявленного при проведении FISH-исследования в препаратах КЛ и НКЛ в различных возрастных группах женщин представлены в **табл. 1**.

Среднее количество клеток с моносомией по хромосоме X статистически значимо различалось между возрастными группами как в КЛ, так и в НКЛ ($p=0,0042$ и $p=0,0001$ соответственно). Так, в КЛ доля клеток с моносомией X составила 1,83% у женщин 20—29 лет, 2,23% у женщин 30—39 лет и 5,43% у женщин 40—49 лет. В НКЛ уровень моносомии по хромосоме X составил 1,83% в группе женщин 20—29 лет, 2,23% у женщин 30—39 лет и 5,88% у женщин 40—49 лет. У женщин в возрасте 40—49 лет доля клеток с X-моносомией как в КЛ, так и в НКЛ почти в 3 раза превышала уровень моносомии X у женщин 20—29 лет.

Кроме того, в КЛ и в НКЛ обнаружен клон с трисомией по хромосоме X, причем средняя частота аномального клона в КЛ статистически значимо ($p=0,0031$) различалась между группами и составила 0,66% для женщин в возрасте 20—29 лет, 0,86% — в возрасте 30—39 лет и 1,95% — в возрасте 40—49 лет. Уровень трисомии по хромосоме X в НКЛ статистически значимо не различался между группами и составил 0,81% в 20—29 лет, 0,84% в 30—39 лет и 1,25% в 40—49 лет.

Таким образом, в НКЛ так же, как и в КЛ присутствовали клоны как с моносомией, так и с трисомией

по хромосоме X, причем доля клеток с моносомией увеличивается с возрастом.

В **табл. 2** представлена частота анеуплоидии по хромосоме X, выявленной при проведении FISH-исследования в препаратах клеток БЭ, полученных от 34 женщин различных возрастных групп.

При молекулярно-цитогенетическом анализе клеток БЭ так же, как и в клетках крови, обнаружен низкоуровневый гоносомный мозаицизм, при котором частота клона с анеуплоидией не превышала 7% и 10% соответственно. Средние значения доли БЭ с X-анеуплоидией статистически значимо ($p=0,530$) не различались между группами и в среднем составили 4%. Кроме того, в отличие от КЛ, в клетках БЭ не отмечено присутствие клона с трисомией по X хромосоме.

На **рис. 1** представлен график, отражающий тенденцию к увеличению доли анеуплоидных клеток как с моносомией, так и с трисомией по хромосоме X у женщин старшего возраста в КЛ, тогда как в БЭ такой тенденции не наблюдается.

Полученные данные по частоте мозаицизма по хромосоме X в различных тканях у фертильных здоровых женщин репродуктивного возраста позволили разработать протокол дальнейшего обследования при выявлении клона клеток с X-анеуплоидией при стандартном цитогенетическом исследовании (**рис. 2**).

Так, если при проведении стандартного цитогенетического исследования у женщины обнаружен клон

Таблица 1.

Частота анеуплоидии по X-хромосоме в КЛ и НКЛ у женщин разных возрастных групп

Возрастные группы	Средняя частота клона XX-клеток, %		Частота клона X-клеток, %		Частота клона XXX-клеток, %	
	НКЛ	КЛ	НКЛ	КЛ	НКЛ	КЛ
20—29 лет ($n=11$)	97,36	97,51	$1,83 \pm 0,57$ min 1,45 max 2,91	$1,83 \pm 0,65$ min 0,50 max 2,42	$0,81 \pm 0,37$ min 0,00 max 1,93	$0,66 \pm 0,68$ min 0,00 max 2,40
30—39 лет ($n=13$)	96,92	96,91	$2,23 \pm 0,63$ min 1,46 max 3,74	$2,23 \pm 0,68$ min 0,98 max 2,90	$0,84 \pm 0,85$ min 0,00 max 1,92	$0,86 \pm 0,84$ min 0,00 max 1,93
40—49 лет ($n=8$)	92,87	92,62	$5,88 \pm 5,89$ min 2,72 max 9,7	$5,43 \pm 2,47$ min 2,14 max 7,89	$1,25 \pm 0,64$ min 0,20 max 2,24	$1,95 \pm 0,64$ min 0,37 max 3,45

Примечание: n — число обследованных. Здесь и далее данные представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($\text{Mean} \pm \text{SD}$), приведены минимальные и максимальные значения.

Таблица 2.

Частота анеуплоидии хромосоме X в клетках БЭ у женщин различных возрастных групп

Возрастные группы, n (число обследованных)	Средняя частота клона XX-клеток, %	Частота клона X-клеток, %
20—29 лет ($n=11$)	95,68	$4,32 \pm 1,47$
30—39 лет ($n=12$)	95,91	$4,09 \pm 1,30$
40—49 лет ($n=11$)	96,39	$3,61 \pm 1,73$

Рис. 1. График изменения доли клонов клеток X и XXX в БЭ и КЛ с возрастом.

с анеуплоидией по хромосоме X, необходимо проведение молекулярно-цитогенетического исследования на препаратах КЛ или НКЛ. В случаях, когда уровень обнаруженного гоносомного мозаицизма соответствует представленным значениям, можно предположить, что мозаицизм является физиологическим и не ассоциирован с репродуктивными проблемами у женщины.

Если же уровень мозаицизма превышает установленные в ходе исследования верхние (референсные) границы доли клеток с анеуплоидией по хромосоме X, необходимо провести дополнительный FISH-анализ на клетках БЭ. В случаях, когда уровень гоносомного мозаицизма в клетках БЭ ниже либо равен максимальному уровню референсного значения мозаицизма в соответствующей возрастной группе, можно сделать вывод, что обнаруженный ранее мозаицизм в КЛ является физиологическим. Если же уровень мозаицизма в БЭ превышает данные значения, можно предположить, что мозаицизм может быть ассоциирован с репродуктивными проблемами, такими как бесплодие или невынашивание беременности.

Обсуждение

Многие супружеские пары с репродуктивными проблемами обращаются за медико-генетическим консультированием с целью диагностики причин бесплодия и невынашивания беременности и решения этих проблем. В таких случаях обычно проводится стандартное цитогенетическое исследование — анализ кариотипа супругов для выявления хромосомных аномалий, являющихся генетическими факторами, которые могут быть причиной репродуктивных проблем. Такими факторами могут быть носительство сбалансированной хромосомной перестройки, а также наличие хромосомного мозаицизма у одного из супругов [4]. Если носительство сбалансированной аномалии хромосом

Рис. 2. Протокол обследования пациентов при обнаружении низкоуровневого мозаицизма по хромосоме X (* — указаны верхние границы доли клеток с X-анеуплоидией, табл. 1).

связано с нарушениями репродукции, то проблема ассоциации низкоуровневого гоносомного мозаицизма с невынашиванием беременности и бесплодием у женщин репродуктивного возраста до сих пор окончательно не решена. Доля пациенток с гоносомным мозаицизмом довольно высока [1], однако не всегда очевидно, является ли обнаруженный мозаицизм причиной репродуктивных проблем.

Гоносомный мозаицизм может быть ассоциирован не только с репродуктивными проблемами, но и с возрастом. Феномен возрастзависимой анеуплоидии по хромосоме X у фенотипически нормальных женщин описан еще в 80-х годах прошлого века, когда было установлено, что уровень гоносомного мозаицизма у женщин репродуктивного возраста варьирует от 2 до 10% [11, 12, 13]. Позднее, в 2007 году Russell L. с соавт. подтвердили наличие низкоуровневого гоносомного мозаицизма в КЛ. Авторы отметили, что в некоторых случаях уровень X-анеуплоидии в КЛ здоровых женщин без репродуктивных проблем может превышать 10%. Кроме того, была отмечена тенденция к увеличению доли гоносомной анеуплоидии с возрастом и определена средняя частота моносомии у женщин различных возрастных групп: 20—30 лет — 1,5%; 30—40 лет — 3% и 40—50 лет — 5% [7].

Однако имеются сообщения, что уровень X-анеуплоидии у здоровых женщин может быть выше. Так, Nowinski G. с соавт. подтвердили, что доля клеток с анеуплоидией по X хромосоме в КЛ увеличивается с возрастом женщины, при этом частота клона клеток с моносомией по хромосоме X в клетках КЛ может достигать 21,4% у женщин старше 44 лет. Также было отмечено присутствие в крови у женщин клона клеток с трисомией по хромосоме X. Уровень мозаицизма по трисомному клону у женщин в возрасте 23—34 года был 4,0%, в 35—44 года — 8,9% и у женщин старше 44 лет — 14,3%, в то время как у женщин младше 23 лет этот клон не обнаружен. Авторы отмечают, что в КЛ у женщин всех возрастных групп наблюдается мозаицизм не только по хромосоме X, но и по аутосомам [14]. По результатам нашего исследования средняя частота клеток как с моносомией, так и с трисомией по хромосоме X значительно ниже, чем представлено в работе Nowinski G. с соавт. Отличия в полученных данных можно объяснить различными методическими подходами к анализу мозаичной X-анеуплоидии. В цитируемой работе анализ проводили путём стандартного цитогенетического исследования КЛ периферической крови, в каждом случае анализировали 15—30 метафазных пластинок, что не всегда позволяет выявить низкоуровневый мозаицизм. Кроме того, высока вероятность артефактной потери хромосом в метафазных пла-

стинках при приготовлении препарата. В более поздних работах [7] также проводилось стандартное цитогенетическое исследование метафазных пластинок КЛ периферической венозной крови, анализировали 25—35 клеток, что повышало вероятность обнаружения низкоуровневого мозаицизма и давало возможность получать статистически более точные результаты. Использование в нашем исследовании FISH-метода для анализа уровня мозаичной X-анеуплоидии в интерфазных ядрах как культивированных, так и некультивированных лимфоцитов, с одной стороны, дало возможность проанализировать большее количество клеток и, с другой стороны, позволило исключить артефактную анеуплоидию.

В работе Назаренко С.А. с соавт. показаны статистически значимые возрастзависимые различия в значениях уровня X-анеуплоидии в различных тканях [8]. Полученные нами данные не вполне согласуются с этими результатами, поскольку определено, что уровни анеуплоидии по хромосоме X в КЛ и НКЛ статистически достоверно не различаются в разных возрастных группах. Мы полагаем, что такие различия могут быть связаны с различиями в составе культивированных и некультивированных клеток периферической крови. В препаратах из КЛ присутствуют только Т-лимфоциты, тогда как в препаратах из НКЛ представлены все виды белых клеток периферической венозной крови, в том числе гранулоциты и незрелые пролиферативные клетки, в которых также присутствует низкоуровневый гоносомный мозаицизм, уровень которого сопоставим с уровнем X-анеуплоидии в культивированных Т-лимфоцитах [15]. Таким образом, доля клеток с гоносомной анеуплоидией в НКЛ и КЛ не должна существенно различаться. Также, в нашей работе для FISH-анализа использованы коммерческие ДНК-зонды, обладающие высокой, близкой к 100%, эффективностью гибридизации.

Мозаичная X-анеуплоидия в клетках БЭ исследована в меньшей степени, чем в клетках периферической крови. Так, Schad C. с соавт. при проведении молекулярно-цитогенетического исследования клеток БЭ с использованием зондов на центромерные районы X и Y хромосом установили, что уровень гоносомного мозаицизма в БЭ женщин без репродуктивных проблем составляет 1,1%. При этом указывается, что уровень мозаицизма в БЭ даже у пациенток с аномалиями половых хромосом не отличается от этого значения. Однако авторы отмечают, что при преждевременном истощении яичников, уровень гоносомного мозаицизма может достигать 12% [16]. В нашем исследовании показано, что в БЭ здоровых женщин репродуктивного возраста уровень гоносом-

ного мозаицизма выше и составляет в среднем 4%. Различия в полученных данных можно объяснить использованием дополнительного аутосомного ДНК-зонда, в частности, на центромерный район хромосомы 18, что может служить не только контролем ploидности клеток, но и эффективности гибридизации. Это позволяет повысить точность полученных данных и сделать однозначный вывод о наличии мозаицизма [6].

Кроме того, нами отмечено, что в БЭ у фенотипически нормальных женщин репродуктивного возраста отсутствует клон с трисомией по хромосоме X, который отмечается как в КЛ, так и НКЛ. Можно предположить, что наличие клона клеток XXX является тканеспецифичным и характерным для периферической крови. Наличие клонов, как с моносомией, так и с трисомией по X хромосоме позволяет говорить о том, что механизмом возникновения мозаицизма в клетках крови является нерасхождение хромосом, тогда как в БЭ основным механизмом является анафазное отставание [17].

В настоящее время принято считать, что клинически значимым является гоносомный мозаицизм, при котором частота аномального клона с X-анеуплоидией в КЛ составляет более 10% [2,3]. Более детальный анализ мозаичной X-анеуплоидии в различных возрастных группах здоровых женщин показал, что значения уровня анеуплоидии по хромосоме X могут достаточно сильно варьировать. При этом уровень анеуплоидии по хромосоме X в БЭ сопоставим у здоровых женщин всех возрастов и составляет в среднем 4%.

По результатам работы составлен протокол обследования пациентов при обнаружении клона с гоносомной анеуплоидией. В случаях, когда доля клона с моносомией или трисомией по хромосоме X превышает установленные в ходе исследования верхние границы уровня анеуплоидных клеток для данного возраста, рекомендуется проводить дополнительный анализ клеток БЭ, который может стать определяющим фактором в постановке диагноза.

Выводы

В результате исследования произведена оценка уровня возрастзависимого, тканеспецифичного мозаицизма по хромосоме X у фенотипически нормальных женщин, получены значения уровня гоносомного мозаицизма, которые можно считать референсными для БЭ и КЛ, а также разработан протокол диагностики соматического тканеспецифичного мозаицизма по хромосоме X.

Список литературы

1. Morel F., Gallon F., Amice V., et al. Sex chromosome mosaicism in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 2002; 17 (10): 2552-5.
2. Gardner R.J.M., Sutherland G.R. Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling. Oxford University Press. 2004; 4: 201.
3. Madan K., Lundberg E.S. Low grade mosaicism for X aneuploidy in women referred for recurrent abortions. *E.C.A. Newsletter.* 2015; 35: 9-12
4. De Braekeleer M., Dao T.N. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod.* 1991;6 (2): 245-50.
5. Delhanty J.D. Inherited aneuploidy: germline mosaicism. *Cytogenet Genome Res.* 2011; 133 (2-4):136-40.
6. Шилова Н.В., Золотухина Т.В. Интерфазная флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) в диагностике числовых хромосомных aberrаций. *Медицинская генетика.* 2007; 10: 53-58
7. Russell L.M., Strike P., Browne C.E., Jacobs P.A. X chromosome loss and ageing. *Cytogenet Genome Res.* 2007; 116 (3): 181–185.
8. Назаренко С.А., Тимошевский В.А., Островерхова Н.В. Интерфазный анализ X-анеуплоидии методом флуоресцентной гибридизации *in situ* в разных тканях здоровых лиц. *Генетика.* 1997; 33 (10): 1426-1430.
9. Гинтер Е.К., Золотухина Т.В., Антоненко В.Г. и др. Цитогенетические методы диагностики хромосомных болезней. Методическое пособие для врачей. М. 2009.
10. Halder A., Fauzdar A. Potential use of blood, buccal and urine cells for rapid noninvasive diagnosis of suspected aneuploidy using fluorescence in situ hybridization (FISH). *J Clin Diagn Res.* 2007; 1 (2): 33-38.
11. Meyers C.M., Simpson J.L., Martin A.O., Elias S. Hypermodal cells, hypomodal cells, and repetitive abortions. *Fertil Steril.* 1986; 46 (4): 615-8.
12. Horsman D.E., Dill F.J., McGillivray B.C., Kalousek D.K. X chromosome aneuploidy in lymphocyte cultures from women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Med Genet.* 1987; 28 (4): 981-7
13. Hassold T., Jacobs P.A., Pettay D. Cytogenetic studies of couples with repeated spontaneous abortions of known karyotype. *Genet Epidemiol.* 1988; 5 (2): 65-74.
14. Nowinski G.P., van Dyke D.L., Tilley B.C., et al. The frequency of aneuploidy in cultured lymphocytes is correlated with age and gender but not with reproductive history. *Am. J. Hum. Genet.* 1990; 46 (6): 1101-1111.
15. Mukherjee A.B., Alejandro J., Payne S., Thomas S. Age-related aneuploidy analysis of cells in vivo by fluorescence hybridization (FISH). *Mech Ageing Dev.* 1996; 90 (2): 145-156
16. Schad C.R., Kuffel D.G., William A.W., et al. Application of Fluorescent In Situ Hybridization With X and Y Chromosome Specific Probes to Buccal Smear Analysis. *Am J Med Genet.* 1996; 66 (2): 187-92.
17. Лебедев И.Н., Никитина Т.В. На пути от цитогенетики к цитогеномике ранних репродуктивных потерь. Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике под ред. А.Б. Масленникова. Новосибирск: Академиздат. 2014; 21: 3-84.

References:

1. Morel F., Gallon F., Amice V., et al. Sex chromosome mosaicism in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 2002; 17 (10): 2552-5.
2. Gardner R.J.M., Sutherland G.R. Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling. Oxford University Press. 2004; 4: 201.
3. Madan K., Lundberg E.S. Low grade mosaicism for X aneuploidy in women referred for recurrent abortions. *E.C.A. Newsletter.* 2015; 35: 9-12

4. De Braekeleer M., Dao T.N. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod.* 1991;6 (2): 245-50.
5. Delhanty J.D. Inherited aneuploidy: germline mosaicism. *Cytogenet Genome Res.* 2011; 133 (2-4):136-40.
6. Shilova N.V., Zolotukhina T.V. Interfaznaya fluorescentnaya in situ gibrizatsiya (FISH) v diagnostike chislovykh hromosomnykh aberratsiy. [Interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting of numerical chromosome aberrations]. *Meditsinskaya genetika* [Medical genetics] 2007; (10): 53-58. (In Russ.)
7. Russell L.M., Strike P., Browne C.E., Jacobs P.A. X chromosome loss and ageing. *Cytogenet Genome Res.* 2007; 116 (3): 181–185.
8. Nazarenko S.A., Timoshevskii V.A., Ostroverkhova N.V. Interfazny analiz X-aneuploidii metodom fluorescentnoy gibrizatsii in situ v raznykh v raznykh tkanyakh zdorovykh lits [Interphase Analysis of X-Aneuploidy by the Fluorescence in situ Hybridization in Various Tissues of Healthy Individuals]. *Genetika* [Genetics]. 1997; 33 (10): 1426-1430. (In Russ.)
9. Ginter E.K., Zolotuhina T.V., Antonenko V.G. i dr. Citogeneticheskie metody diagnostiki hromosomnykh boleznej [Cytogenetic methods for the diagnosis of chromosomal diseases]. *Metodicheskoe posobie dlya vrachej* [Handbook for doctors]. Moscow, 2009. (In Russ.)
10. Halder A., Fauzdar A. Potential use of blood, buccal and urine cells for rapid noninvasive diagnosis of suspected aneuploidy using fluorescence in situ hybridization (FISH). *J Clin Diagn Res.* 2007; 1 (2): 33-38.
11. Meyers C.M., Simpson J.L., Martin A.O., Elias S. Hypermodal cells, hypomodal cells, and repetitive abortions. *Fertil Steril.* 1986; 46 (4): 615-8.
12. Horsman D.E., Dill F.J., McGillivray B.C., Kalousek D.K. X chromosome aneuploidy in lymphocyte cultures from women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Med Genet.* 1987; 28 (4): 981-7
13. Hassold T., Jacobs P.A., Pettay D. Cytogenetic studies of couples with repeated spontaneous abortions of known karyotype. *Genet Epidemiol.* 1988; 5 (2): 65-74.
14. Nowinski G.P., van Dyke D.L., Tilley B.C., et al. The frequency of aneuploidy in cultured lymphocytes is correlated with age and gender but not with reproductive history. *Am. J. Hum. Genet.* 1990; 46 (6): 1101-1111.
15. Mukherjee A.B., Alejandro J., Payne S., Thomas S. Age-related aneuploidy analysis of cells in vivo by fluorescence hybridization (FISH). *Mech Ageing Dev.* 1996; 90 (2): 145-156
16. Schad C.R., Kuffel D.G., William A.W., et al. Application of Fluorescent In Situ Hybridization With X and Y Chromosome Specific Probes to Buccal Smear Analysis. *Am J Med Genet.* 1996; 66 (2): 187-92.
17. Lebedev I.N., Nikitina T.V. Na puti ot citogenetiki k citogenomike rannih reproduktivnykh poter' [On the way from cytogenetics to cytogenomics of early reproductive losses]. *Molekulyarno-biologicheskie tekhnologii v meditsinskoj praktike* pod red. Maslennikova [Molecular biological technologies in medical practice, ed. by Maslennikov A.B.]. Novosibirsk 2014; 21: 3-84. (In Russ.)