
Клиническая медицина

УДК 576.312.37:618.3-06

АНАЛИЗ АНОМАЛИЙ КАРИОТИПА ПЛОДА ПРИ НЕРАЗВИВАЮЩЕЙСЯ БЕРЕМЕННОСТИ, НАСТУПИВШЕЙ ЕСТЕСТВЕННЫМ ПУТЕМ

С. В. Тихомирова^{1,2*}, кандидат биологических наук,

А. Г. Диунов¹, кандидат медицинских наук,

Е. Ю. Палютина¹, кандидат медицинских наук,

А. К. Мешкова²,

Н. А. Смирнова¹

¹ ГБОУ ВПО «Ярославский государственный медицинский университет», 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5

² ГБУЗ ЯО «Областной перинатальный центр», 150042, Россия, г. Ярославль, Тутаевское шос., д. 31в

РЕЗЮМЕ В работе представлены результаты цитогенетического исследования абортного материала от пациенток с неразвивающейся беременностью, наступившей естественным путем. Выявлено, что преобладающим типом нарушения являются трисомии и триплоидии. Проанализированы частота и спектр хромосомной патологии с учетом возраста пациенток, наличия замершей беременности в анамнезе и срока остановки развития плода. Полученные результаты сопоставимы с аналогичными отечественными и зарубежными данными.

Ключевые слова: неразвивающаяся беременность, анеуплоидия, кариотипирование, хромосомные аномалии, мозаицизм.

* Ответственный за переписку (corresponding author): Svetlana-yar-2010@yandex.ru

Проблема замершей беременности имеет не только медицинское, но и социальное значение: 12–20% всех клинически установленных беременностей заканчиваются самопроизвольным выкидышем [8]. Нарушение репродуктивной функции женщины, выразившееся в спонтанном прерывании беременности, может быть обусловлено действием различных факторов. Это гормональные нарушения, воспалительные заболевания, нарушения обмена веществ и процессов свертывания крови, анатомические дефекты половых органов, сбалансированные хромосомные перестройки родителей, влияние эмбриотоксических и тератогенных веществ

[9]. Известно, что в 60–70% случаев самопроизвольных выкидышей I триместра к остановке развития беременности приводят аномалии кариотипа плода [11]. Однако очень часто причины замершей беременности остаются невыясненными.

Настоящее исследование является первым этапом работы по изучению генетической природы невынашивания беременности. Целью исследования было сравнительное изучение частоты и спектра аномалий кариотипа при неразвивающейся беременности, наступившей естественным путем.

THE ANALYSIS OF FETUS KARIOTYPE ABNORMALITIES IN UNDEVELOPED NATURAL PREGNANCY

S. V. Tikhomirova, A. G. Diunov, E. Yu. Paliutina, A. K. Meshkova, N. A. Smirnova

ABSTRACT The results of cytogenetic study of abortion material of patients with undeveloped natural pregnancy were presented in the report. It was revealed that trisomy and triploid were the predominant types of the abnormality. Frequency and spectrum of chromosome pathology were analyzed with due regard to patient age, “standstill” pregnancy presence in anamnesis and fetus development stoppage date. The obtained results were comparable with analogous data of native and foreign reports.

Key words: undeveloped pregnancy, aneuploidy, karyotyping, chromosome abnormalities, variegation.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проанализирован абортный материал от 64 женщин в возрасте 20–47 лет (средний возраст $31,5 \pm 6,1$ года) с подтвержденным диагнозом «неразвивающаяся беременность» (НБ). Срок беременности и характер нарушений эмбрионального развития определялись ультразвуковыми методами. Срок остановки развития беременности варьировал от 5 до 12 недель гестации (в среднем $7,62 \pm 1,83$ нед.).

Критериями для постановки диагноза НБ являлись: несоответствие размеров матки предполагаемому сроку беременности; несоответствие размеров плодного яйца ожидаемым эхо-параметрам на определенном сроке беременности; отсутствие сердцебиения и двигательной активности эмбриона; отсутствие сформированного эмбриона в полости плодного яйца – анэмбриония.

Дополнительно оценивали уровень хорионического гонадотропина в крови, который был ниже нормативных показателей предполагаемого срока беременности. В случае диагностики замершей беременности всем пациенткам проводилась вакуум-аспирация плодного яйца. Операционный материал, представленный элементами эмбриона, хориона и децидуальных оболочек, доставлялся не позднее 1–3 часов после операции в клинику-диагностическую лабораторию Областного перинатального центра Ярославской области.

Препараты метафазных хромосом получали из клеток цитотрофобласта ворсинчатого хориона «прямым» методом по общепринятой методике [3]. По окончании гипотонической обработки клетки фиксировали смесью этилового спирта и уксусной кислоты в соотношении 3:1. Мацерацию клеток проводили в 60%-ном растворе уксусной кислоты. Хромосомы окрашивали «рутинным» методом – раствором красителя Гимза, приготовленным на фосфатном буфере. Часть препаратов окрашивали GTG-методом с предварительной трипсонизацией. Препараты анализировали с помощью микроскопа OLYMPUS BX51, оснащенного камерой с использованием программы ВидеоТест-Карио 3.1. При кариотипировании руководствовались правилами, рекомендованными для цитогенетических исследований. Помимо определения кариотипа, учитывали частоту встречаемости спонтанных хромосомных aberrаций.

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью электронных таблиц Microsoft Excel и пакета прикладных программ Statistica for Windows v.7.0, StatSoft Inc.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе стандартного кариотипирования аномальный кариотип был выявлен в 71,8% случаев замерших беременностей. Далее на основании результатов цитогенетического исследования кариотипа плода были сформированы две группы: в I группу вошли 46 пациенток с выявленными аномалиями кариотипа плода, во II группу – 18 женщин с нормальным кариотипом плода.

Преобладающим типом нарушения кариотипа являлась трисомия. В 26 случаях (57%) это были изолированные трисомии по разным хромосомам: 3 случая – по группе А (2-я и 3-я хромосомы); 1 – по группе В (4-я хромосома); 8 – по группе С; 4 – по группе D (13-я, чаще 1-я хромосомы), 5 – группа Е (16-я и 18-я хромосомы); 1 – группа F (20-я хромосома); 4 – группа G (21-я, 22-я хромосомы.) В 1 образце (2%) встретилась двойная трисомия и в 1 (2%) – множественная. Шесть кариотипов (13%) были представлены триплоидией.

В числе прочих анеуплоидий следует отметить моносомию по хромосоме X – 3 случая (6,5%). Примеры исследуемых образцов представлены на рис. 1.

Один образец хориона (2%) был тетраплоидным, по данным УЗИ диагностирована анэмбриония, данный тип нарушения эмбрионального развития встречался и при трисомиях. Спектр хромосомных нарушений представлен на рис. 2.

В I группе помимо геномных были выявлены и структурные мутации. Структурные нарушения встречались в 5 образцах (10,9%) и сочетались с анеуплоидией, были представлены маркерными хромосомами, делециями, дериватными хромосомами.

В 4 случаях (8,6%) из 46 были отмечены спонтанные (нестабильные) хромосомные aberrации (ХА). При кариотипировании регистрировались все aberrации хроматидного и хромосомного типа, учитывались такие образцы, где уровень митозов с дицентрическими хромосомами, однохроматидными, двуххроматидными фрагментами, разрывами хромосом составлял 15% и более. Возможные варианты представлены на рис. 3.

Полученные нами результаты – 71,8% аномальных кариотипов при НБ I триместра – соответствуют данным научной литературы. Также совпадает распределение по хромосомам с полученными ранее результатами. Наиболее часто встречались трисомии по 15-й, 16-й и 18-й хромосомам [13].

Выявленные анеуплоидные нарушения в 19% являлись мозаичными. Следовательно, не только

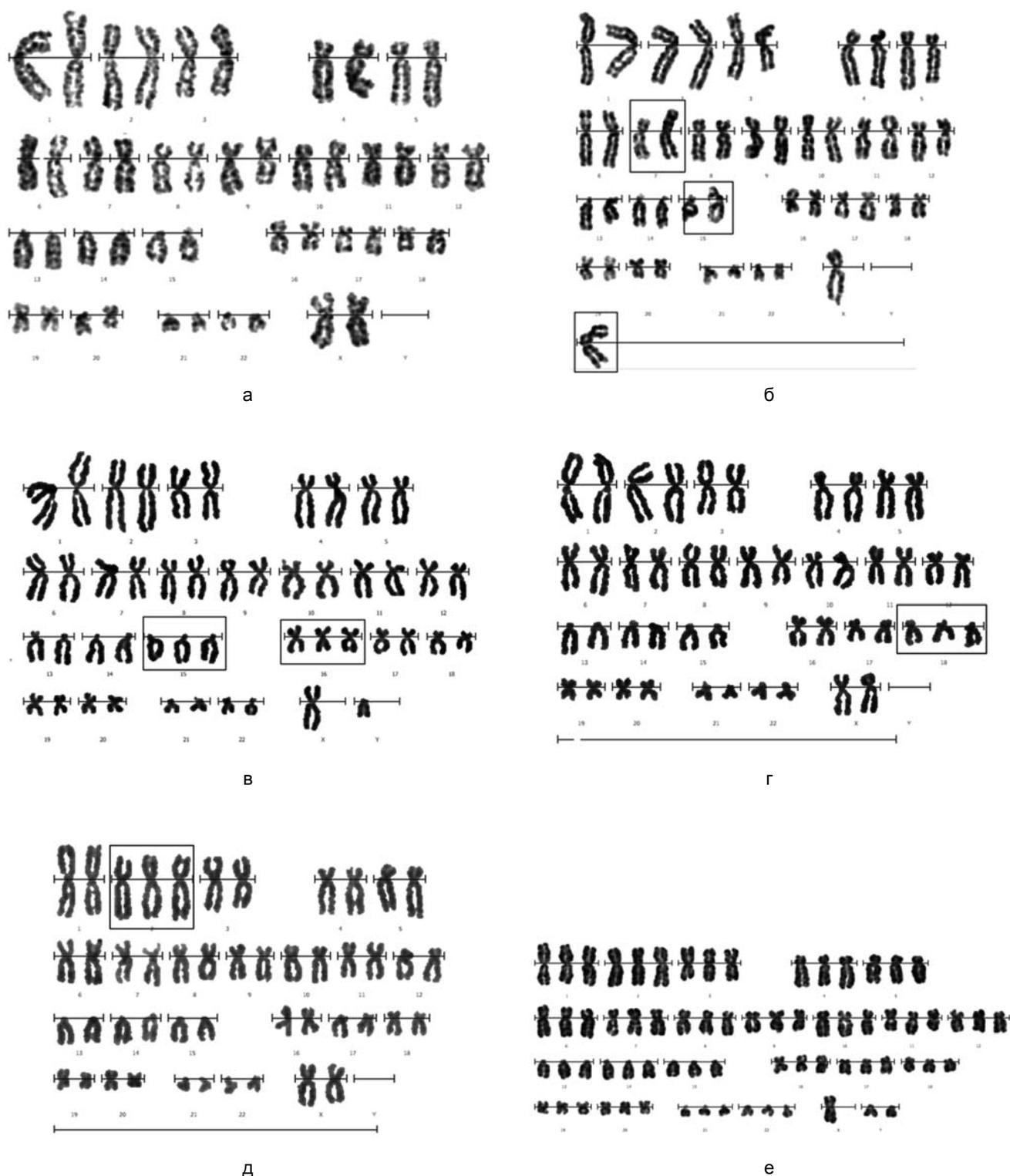


Рис. 1. Примеры кариограмм. Об. 100, ок. 10:

а – нормальный кариотип: 46,XX (окраска GTG),

б – сочетанные структурные и геномные мутации: 46,X, rob(D;G), der(D;D)? (окраска GTG),

в – двойная трисомия: 48,XY,+15,+16 (окраска р-ром Гимза),

г – регулярная трисомия: 47, XX+18, С-м Эдвардса (окраска р-ром Гимза),

д – регулярная трисомия: 47,XX+2 (окраска GTG),

е – триплоидия: 69,ХУУ (окраска GTG)



Рис. 2. Частота и спектр хромосомных аномалий кариотипа в абортном материале пациенток с неразвивающейся беременностью

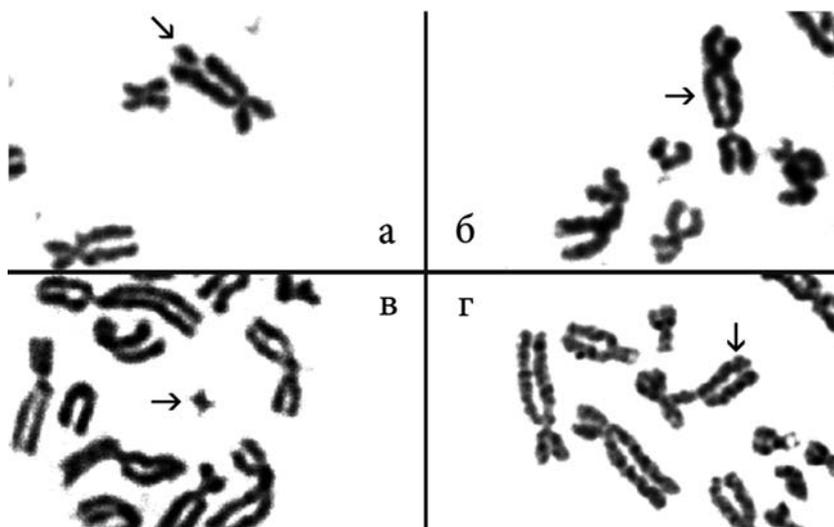


Рис. 3. Спонтанные хромосомные aberrации. Окраска р-ром Гимза. Об. 100, ок. 10:

- а – одиночный фрагмент,
- б – дицентрическая хромосома,
- в – сверхчисленный маркер,
- г – aberrация хроматидного типа

регулярные, но и мозаичные формы численных хромосомных аномалий во многих случаях могут приводить к внутриутробной гибели плода. Но нельзя исключать и наличие такого механизма, как «коррекция трисомной зиготы». В данном случае, если зигота является трисомной, то возникновение хромосомного мозаицизма может быть обусловлено митотическим нерасхождением или анафазным отставанием дополнительной хромосомы в ряде клеток на постзиготической стадии развития [5].

Второй по численности аномалией кариотипа в группе I была триплоидия, которая часто возника-

ет как результат диандрии (удвоения отцовского генома) или диспермии (оплодотворение 2 сперматозоидами), в остальных случаях как результат дигинии (удвоение женского генома). Из 6 триплоидных образцов (13%) замершей беременности два представляли собой пузырный занос. Такой вид нарушения развития трофобласта встречался и при кариотипе 46,XX (11% нормальных кариотипов), поскольку возможная генетическая причина данного нарушения – дигения с потерей генома сперматозоида недоступна для диагностики методом стандартного кариотипирования, необходимо исследование генотипа [7].

Установлено, что риск хромосомной патологии у плода положительно коррелирует с возрастом матери [1]. В нашем исследовании в случае наличия хромосомной патологии возраст пациенток был достоверно выше – $32,65 \pm 6,30$ года в I группе (против $27,23 \pm 3,37$ года во II группе, ($p \leq 0,05$). Также выявлены статистически значимые положительные корреляции между возрастом женщин и наличием трисомий ($r = 0,42$, $p \leq 0,05$), что соответствует и данным других авторов [3].

Изменения кариотипа плода чаще возникали у пациенток, уже имевших НБ в анамнезе, в среднем количество замерших беременностей в I группе – $2,13 \pm 1,31$ (52% женщин), во II группе – $1,14 \pm 0,27$ (38%) ($p \leq 0,05$). Это позволило предположить, что некоторые пациентки имели генетическую предрасположенность к НБ. Среди причин можно выделить полиморфизмы генов обмена фолатов GSTT1, GSTM, MTHFR, MTRR у родителей (чаще матерей) [6], генные болезни, носительство родителями сбалансированных хромосомных перестроек (в популяции встречаются не более чем у 3–5%). Полногеномное секвенирование позволило выявить критические локусы ряда хромосом, ассоциированные с привычным невынашиванием [2, 10].

Мы не обнаружили связи между усредненным сроком гестации и наличием или отсутствием хромосомных изменений в абортном материале – в I и II группах соответственно $7,7 \pm 1,9$ и $7,1 \pm 1,3$ нед. ($p \geq 0,05$). Однако сравнение распределения срока спонтанного прерывания беременности показало, что во II группе максимум случаев НБ приходится на период 6–8 недель гестации. Следовательно, период, соответствующий началу формирования плаценты и активному органогенезу, является критическим для эмбрионального развития человека [3], и ведущую роль в прерывании беременности могут играть такие негенетические факторы, как недостаточность синтеза хорионического гонадотропина, дефицит прогестерона, гиперандрогения, инфекционный фактор, антифосфолипидный синдром, повреждающее действие экзогенных агентов [7].

Одним из важнейших показателей, который отражает различия в жизнеспособности организмов разного пола в различные периоды онтогенеза, является соотношение полов (СП – отношение числа особей мужского пола к числу особей женского). Первичное соотношение полов, возникающее при оплодотворении, достоверно неизвестно. Вторичное СП, которое устанавливается у новорожденных, т. е. после пренатального

естественного отбора, равно 1,05–1,07 [1]. СП у спонтанных абортных варьирует от 1,32 до 0,34 [11]. Соотношение полов в нашем исследовании при выявлении аномального кариотипа – 0,76, а в группе с нормальным кариотипом – 0,8, что в целом согласуется с данными [12], представленными ранее.

Такой показатель, как частота и спектр спонтанных хромосомных aberrаций, является маркером подверженности хромосом в настоящий момент какому-либо повреждающему фактору. В нашем исследовании данный факт подтвердился наличием положительных корреляционных связей спонтанных ХА с мозаицизмом ($r = 0,27$, $p \leq 0,05$) и с пороками, регистрируемыми на УЗИ при сроке гестации 11–12 недель (пороки сердца, аномалии нижних конечностей, деформации головы) ($r = 0,30$, $p \leq 0,05$). Это несколько случаев, когда замершая беременность установлена во время скрининга I триместра. Также нами отмечена положительная корреляционная зависимость спонтанных aberrаций плода от возраста матери ($r = 0,31$, $p \leq 0,05$), что является доказательством накопления мутаций в гаметах и может быть причиной бесплодия [4].

ВЫВОДЫ

Таким образом, аномалиям кариотипа принадлежит доминирующее значение в этиологии НБ ранних сроков. Следует также отметить, что отсутствие видимых хромосомных мутаций при стандартном кариотипировании не исключает всего спектра генетических нарушений. В ряде случаев необходимо более детальное заключение с использованием молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических (FISH, CGH) методов.

Внедрение в клиническую практику цитогенетического анализа хориона при НБ позволит в большинстве случаев выявить истинную причину и дать клинические рекомендации. Часто наличие анеуплоидии или полиплоидии при спорадической НБ является случайным процессом. Однако анеуплоидия в абортном материале при привычном невынашивании или наличие структурных изменений хромосом требуют дальнейшего обследования супружеской пары, что позволит выделить группу женщин с высоким риском генетических причин бесплодия и невынашивания или их половых партнеров. В большинстве случаев таким парам показаны вспомогательные репродуктивные технологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова, Н. В. Структура хромосомной патологии при неразвивающейся беременности, наступившей в ходе использования вспомогательных репродуктивных технологий / Н. В. Александрова, О. А. Доронина, О. Р. Баев // Проблемы репродукции. – 2012. – № 2. – С. 51–56.
2. Баранов, В. С. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины / В. С. Баранов. – СПб. : Изд-во Н-Л, 2009. – 528 с.
3. Баранов, В. С. Цитогенетика эмбрионального развития человека / В. С. Баранов, Т. В. Кузнецова. – СПб. : Изд-во Н-Л, 2007. – 640 с.
4. Воробцова, И. Е. Возрастная зависимость частоты стабильных хромосомных aberrаций, определяемых методом FISH, в лимфоцитах здоровых доноров и лиц, подвергшихся неконтролируемому облучению в малых дозах / И. Е. Воробцова, Н. М. Тимофеева, А. Н. Богомазова // Российский биомедицинский журнал Medline.Ru. – 2003. – Т. 4. – С. 125–127.
5. Лебедев, И. Н. Тканеспецифичный плацентарный мозаицизм по аутосомным трисомиям у спонтанных абортусов человека: механизмы формирования и фенотипические эффекты / И. Н. Лебедев, С. А. Назаренко // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 11. – С. 1459–1474.
6. Полиморфизм генов фолатного обмена и болезни человека / И. Н. Фетисова, А. С. Добролюбов, М. А. Липин, А. В. Поляков // Вестник новых медицинских технологий. – 2007. – Т. 10, № 1.
7. Радзинский, В. Е. Неразвивающаяся беременность / В. Е. Радзинский, В. И. Димитрова, И. Ю. Майскова. – М. : Гэотар-медиа, 2009. – 200 с.
8. Сидельникова, В. М. Привычная потеря беременности / В. М. Сидельникова. – М. : Триада-Х, 2002. – 400 с.
9. Сравнительный анализ аномалий кариотипа при неразвивающейся беременности, наступившей естественным путем и с применением вспомогательных репродуктивных технологий / О. Г. Чиряева, Л. И. Петрова, А. А. Пендина, А. В. Тихонова, О. А. Ефимова, В. С. Дудкина, Н. А. Садик // Журнал акушерства и женских болезней. – 2012. – Т. LXI, вып. 3. – С. 132–138.
10. A genome-wide scan in affected sibling pairs with idiopathic recurrent miscarriage suggests genetic linkage / A. Kolte, H. Nielsen, I. Moltke, B. Degn, B. Pedersen, L. Sunde, F. Nielsen, O. Christiansen // Mol. Hum. Reprod. – 2011. – Vol. 6. – P. 379–385.
11. Halder A. Skewed sex ratio and low aneuploidy in recurrent early missed abortion / A. Halder, A. Fauzdar // Indian J. Med Res. – 2006. – Vol. 124. – P. 41–50.
12. Kushnir V. A. Aneuploidy in abortuses following IVF and ICSI / V. A. Kushnir, J. L. Frattarelli // J. Ass. Reprod. Genet. – 2009. – Vol. 26, № 2–3. – P. 93–97.
13. Nagaishi, M. Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan / M. Nagaishi, T. Yamamoto, K. Iinuma // J. Obstet. Gynaecol. Res. – 2004. – Vol. 30. – P. 237–241.