

Л.В. ТАВОКИНА, Н.И. СОПКО,
К.Г. ХАЖИЛЕНКО, Е.В. БАРОНОВА

Клиника «Исида», Киев

МОЛЕКУЛЯРНО- ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АБОРТУСОВ У ЖЕНЩИН С НАРУШЕНИЕМ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ



Известно, что частота хромосомных аномалий среди спонтанных абортусов первого триместра беременности составляет 50–60 %. С помощью сочетания стандартного цитогенетического метода и FISH-анализа на интерфазных ядрах с центромерспецифичными ДНК-пробами к хромосомам 13/21, 14/22, 15, 16, 18, X, Y проведено исследование кариотипов некультивированных клеток ворсин хориона абортусов. Описанный комплексный подход может быть успешно использован для эффективной идентификации хромосомных аномалий в материале спонтанных абортусов. Полученные результаты указывают на необходимость тщательного изучения геномов супружеских пар с привычным невынашиванием в анамнезе, а особенно перед лечением вспомогательными репродуктивными технологиями.

© Л.В. ТАВОКИНА, Н.И. СОПКО, К.Г. ХАЖИЛЕНКО,
Е.В. БАРОНОВА, 2006

Введение. Выяснение причин невынашивания беременности — весьма трудная задача. Этиологическими факторами спонтанных абортусов могут быть эндокринопатии матери, аутоиммунные осложнения (антифосфолипидный синдром, HLA-несовместимость и т.д.), аномалии развития внутренних половых органов, инфекции, применение гормональных контрацептивов, воздействие окружающей среды и многие другие [1].

В период эмбрионального развития у человека погибает около половины всех зачатий, и не менее чем в половине случаев гибель эмбрионов происходит из-за хромосомных нарушений. Значительная часть подобных зародышей элиминируются до имплантации, а из клинически распознаваемых беременностей около 15–20 % погибают в первом триместре [2, 3].

В 0,5–1 % случаев после первого выкидыша наступает второй, третий, и пациентка переходит в категорию больных с привычным невынашиванием беременности. Не исключено, что генетические факторы в этой группе женщин оказываются доминирующими. После нескольких попыток самостоятельно забеременеть супруги обращаются в клиники, где для лечения бесплодия используются вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ). Поэтому в каждом случае самоаборта для правильного планирования последующей беременности и выработки тактики ее ведения большую актуальность приобретает возможность выяснения вероятной причины его возникновения.

Представления о структуре хромосомных аномалий среди замерших беременностей сформированы на основе результатов многочисленных цитогенетических исследований различных тканей зародышей, выполненных с использованием стандартного анализа метафазных хромосом. Однако по данным разных авторов [4, 5], от 5 до 42 % образцов тканей спонтанных абортусов оказываются недоступными для стандартного цитогенетического анализа вследствие дегенерации клеток. С развитием и внедрением в клиническую практику методов молекулярной цитогенетики появились более широкие возможности исследования кариотипа некультивированных клеток спонтанных абортусов.

В настоящей работе представлены результаты комплексного цитогенетического и моле-

кулярно-цитогенетического (FISH-анализ на интерфазных ядрах) исследования хромосомного дисбаланса на материале спонтанных абортусов.

Материалы и методы. Исследование материала спонтанных абортусов и неразвивающихся беременностей в первом триместре проведено у 114 пациенток. Сходные этиологические причины и одинаковая диагностическая тактика при выявлении приведенных форм позволили объединить их под названием «абортусы». I группу составили 63 абортуса, полученные от женщин с невынашиванием беременности, II — группу — 51 абортус от пациенток, забеременевших с применением ВРТ. Возраст женщин колебался от 25 до 46 лет. Всем беременным проводили ультразвуковое исследование в сроке от 5 до 12 нед с помощью аппарата «Медисон-8000» (Корея). Препараты для цитогенетического исследования получали из ворсин хориона с применением общеизвестных методик [6]. Для получения метафазных хромосом использовали «прямой» метод с последовательной обработкой ворсин колхицином, гипотоническим раствором (0,55% KCl) и метанол-уксусным фиксатором с дальнейшей мацерацией их в 60%-ной уксусной кислоте. Цитогенетический анализ метафазных пластинок клеток ворсин хориона осуществляли с помощью рутинного или GTG методов дифференциальной окраски хромосом по длине [7].

Критерием отбора абортусов для интерфазного FISH-анализа явился низкий митотический индекс на препаратах метафазных хромосом. Для FISH-диагностики были использованы препараты ворсин хориона, зафиксированные в метанол-уксусной смеси (3 : 1). Гибридизация *in situ* проведена со специфическими к 13/21, 14/22, 15, 16, 18, X, Y хромосомам альфоидными ДНК-пробами из коллекции цитогенетической лаборатории Национального центра психического здоровья РАМН (Москва, Россия) [8]. Гибридизацию *in situ* осуществляли согласно протоколу, разработанному Soloviev et al. [9]. Детекцию меченных биотином проб ДНК проводили с использованием слоя флюоресцеинавида («Sigma»). Идентификацию хромосом осуществляли с помощью DAPI окраски. Для составления кариотипов хромосом абортусов и регистрации гибридизацион-

ных сигналов использовали программу CytoVision (США).

Результаты исследований и их обсуждение. Основными эхографическими маркерами начинающегося самопроизвольного аборта были частичная отслойка плодного яйца, расположение его в нижнем сегменте матки, наличие субхориальной гематомы, выраженный гипертонус миометрия (рис. 1).

Неразвивающаяся беременность (НБ) у обследованных пациенток протекала по типу анэмбрионии (АЭ) I и II типов. При АЭ отсутствовали практически все экстраэмбриональные образования: желточный мешок, амнион, пупочный канатик, аллантоис. Размеры



Рис. 1. Беременность 5—6 нед. Отслойка плодного яйца и субхориальная гематома

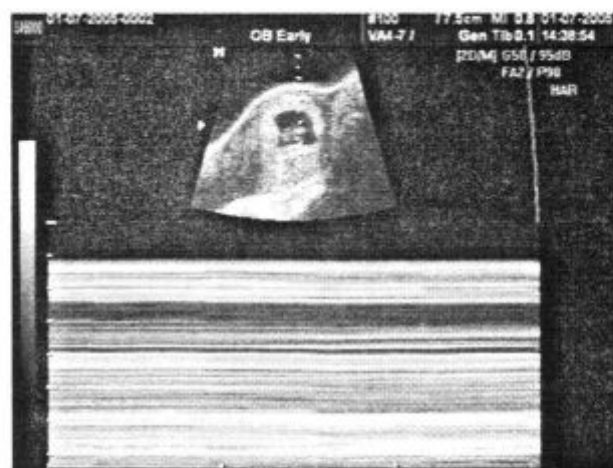


Рис. 2. Неразвивающаяся беременность в сроке 6 нед (отсутствие сердцебиения плода)

плодного яйца независимо от срока беременности редко превышали 30—40 мм в диаметре.

Эхографическим критерием АЭП было отсутствие только эмбриона. Размеры плодного яйца достигали 8—9 нед и почти соответствовали сроку гестации.

Ультразвуковые признаки регрессивной беременности в зависимости от срока гестации и давности гибели эмбриона подразделялись на две группы: 1) наличие эмбриона без признаков жизнедеятельности (отсутствие сердцебиения, движений) (рис. 2); 2) детекция недифференцированного гиперэхогенного участка в виде полосы или отдельных фрагментов, прилежащих к одной из стенок плодного яйца.

В некоторых случаях наступал аутолиз неразвивающегося эмбриона в плодном яйце, что приводило к эхографической картине псевдоанэмбрионии. Обращало на себя внимание изменение эхогенности хориона. Применение цветного доплеровского картирования поз-

воляло выявить прекращение трофобластического кровотока.

Эффективность комплексного молекулярно-цитогенетического исследования составила 93,4 %. В 8 случаях (6,6 %) кариотип абортуса не был установлен: в 2 (1,6 %) из-за полной аплазии эпителия (АЭИ), в 6 (4,9 %) — из-за низкого митотического индекса. Однако, используя FISH-метод диагностики на интерфазных ядрах препаратов последних шести случаев, удалось исключить наиболее часто встречающиеся анеуплоидии по хромосомам 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22, X, Y. Кроме того, для исключения носительства сбалансированных перестроек этой группе супругов было проведено цитогенетическое исследование кариотипа на лимфоцитах периферической крови.

Хромосомные аномалии были обнаружены в 67 (60,1 %) случаях абортусов у обследованных пациенток. В I и II группах женщин частота хромосомной патологии составила 61,9 и 52,3 % соответственно. Анализ полученных данных показал, что доминирующим типом хромосомных аномалий в клетках ворсин хориона абортусов являются анеуплоидии, составляющие 61,3 %, что согласуется с данными литературы [10, 11].

Структура хромосомной патологии среди абортусов 5—10 нед развития представлена в табл. 1.

Наиболее часто встречающимися анеуплоидиями среди абортусов I группы была трисомия по хромосоме 16 (15,4 %), а среди абортусов из II группы — трисомии по хромосомам 16 и 22. Частота двух последних трисомий была одинакова (10,3 %). Моносомия по X-хромосоме в группе женщин с невынашиванием выявлялась достоверно чаще (28,2 и 6,9 %) по сравнению с группой женщин после использования ВРТ ($p < 0,05$).

Частота встречаемости среди абортусов трисомии по хромосоме 21 так же, как и трисомий по хромосомам 2, 3, 8, 9, 15, 20, была в пределах 5 %.

Известно, что врожденные пороки развития, возникающие при трисомии по хромосоме 21, совместимы с жизнью и не приводят к гибели зародыша, как в случае, например, с хромосомой 16 (рис. 3). Полная трисомия хромосомы 16 встречается лишь в материале абортусов [12].

Таблица 1

Структура хромосомной патологии среди абортусов у обследованных пациенток, абс.ч., %

Хромосомная патология	Группа обследованных беременных	
	I, n = 63	II, n = 51
Полдиплоидия	9 (24,1)	9 (31,0)
Трисомия по хромосоме		
16	6 (15,4)	3 (10,3)
22	2 (5,1)	3 (10,3)
13	1 (2,5)	2 (6,9)
18	1 (2,5)	—
21	—	1 (3,4)
8	—	1 (3,4)
20	—	1 (3,4)
15	—	1 (3,4)
3	1 (2,5)	—
2	2 (5,0)	—
9	1 (2,5)	—
Моносомия по X-хромосоме	11 (28,2)	2 (6,9)*
Дисомия X (синдром Клайнфельтера)	2 (5,1)	1 (3,4)
Маркерная хромосома	1 (2,5)	—
Структурные перестройки	2 (5,1)	3 (11,1)
Всего	39 (61,9)	27 (52,3)

*Разница относительно показателя женщин I группы достоверна ($p < 0,05$).

Как правило, на постимплантационных стадиях развития человека хромосомный набор в клетках плодных оболочек соответствует кариотипу плода, однако в некоторых случаях возможно расхождение кариотипов в клетках экстраэмбриональных тканей и плода. По результатам диагностических центров, в которых для кариотипирования используются клетки экстраэмбриональной мезенхимы, цитотрофобласта и амниоциты, в 1–2 % случаев прогрессирующих беременностей имеются цитогенетические аномалии, чаще мозаичные трисомии, ограниченные плацентой [13].

Предполагается, что ограниченный плацентой мозаицизм является неблагоприятным фактором для развития плода. Его частота в материале выкидышей может достигать 13 %, т.е. на порядок выше, чем при проведении пренатальной диагностики [3].

Можно предположить, что в нашем исследовании некоторые из обнаруженных в низком проценте случаев трисомий (хромосомы 2, 3, 8, 9, 15, 20) скорее относятся к цитотрофобласту и экстраэмбриональной мезодерме, чем к кариотипу эмбриона. Показано, что трисомии по хромосомам 16 и 22 имеют мейо-

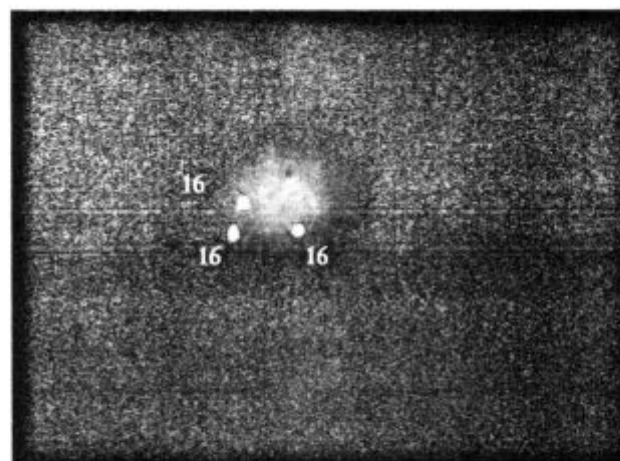
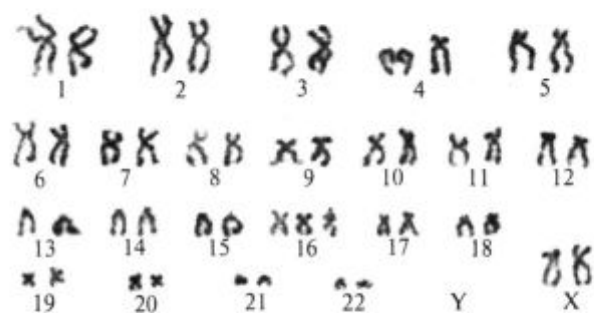


Рис. 3. Кариотип абортуса 47,XX, +16, nuc ish 16 (D16Z1 ×3)

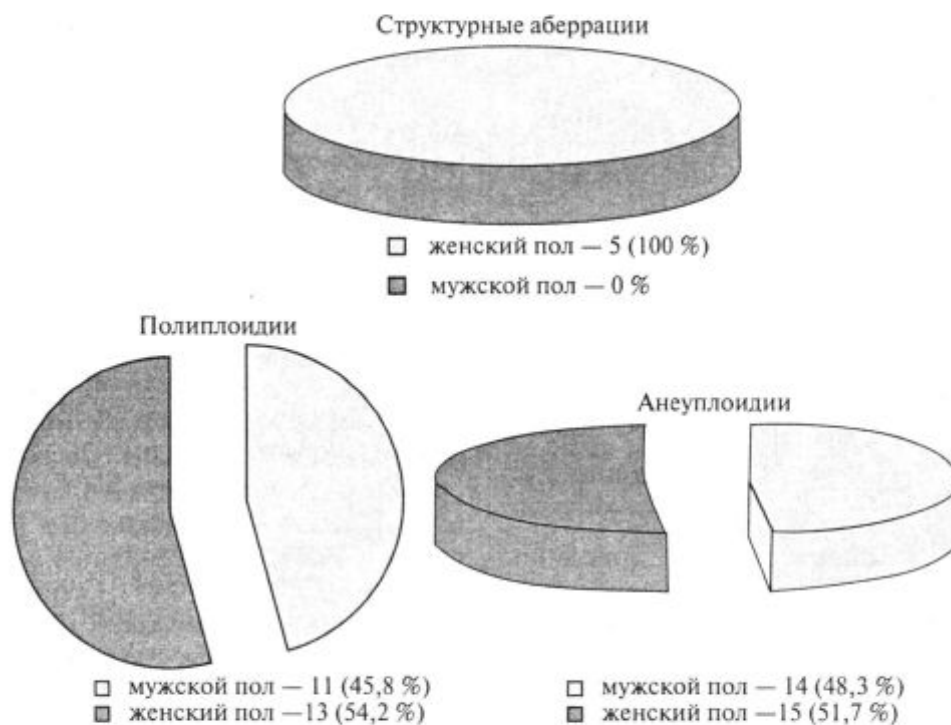


Рис. 4. Распределение мужского и женского полов среди абортусов с различными типами хромосомных аномалий

Таблица 2

Типы хромосомных аномалий в клетках ворсин хориона при неразвивающейся беременности и анэмбрионии, абс.ч., %

Типы хромосомных аномалий	Группа обследованных беременных			
	I, n = 63		II, n = 51	
	НБ	АЭ	НБ	АЭ
Трисомии				
47, XX + 22		1	1	1
47, XY, + 22	1		1	
47, XX, + 13				1
47, XY, + 13	1		1	
47, XY, + 21			1	
47, XX, + 16	4			1
47, XY, + 16	1	1	1	1
47, XY, + 18	1			
48, XX, + 8, + 20			1	
47, XX, + 2 / 46, XX		1		
47, XX, + 2	1			
47, XY, + 15			1	
47, XY, + 3	1			
47, XXY	1	1	1	
47, XX, + 9	1			
47, XX, + mar				1
Моносомии				
45, X	9	1	1	1
45, X / 46, XX	1			
Полипloidии				
69, XXX	3		1	1
69, XXX / 46, XX			1	
69, XXY	5		1	2
69, XXY / 46, XY			1	
92, XXYY	1			
92, XXYY / 46, XY			1	
92, XXXX			1	
Структурные перестройки				
46, XX, t (14,1)			1	
46, XX, t (13;?)			1	
46, XX, del (13)				1
47, XX, t (1;16)	1			
46, Xi (X)		1		
Всего	32(84,2)	6(15,7)	17(63,0)	10(37,0)

тическое происхождение, тогда как трисомии по хромосомам 2, 3, 7, 8 и 9 возникают главным образом в постзиготических митотических делениях [14].

В 18 случаях абортусов, что составило для группы женщин с невынашиванием 24,1 %, а для группы женщин после стимуляции 31,1 %,

был установлен полиплоидный кариотип (триплоидия, реже тетраплоидия). Структурные перестройки в наших исследованиях затронули хромосомы 1, 13, 14, 16 и X. В I группе их было 2 (5,1 %), а во II группе — 3 (11,1 %).

Интересными оказались результаты по соотношению спонтанных абортусов мужского и женского полов в различных группах (рис. 4).

Суммарно в группе зародышей с аномальным кариотипом случаев женского пола было несколько больше: 33 (56,9 %) — женский пол, 25 (43,1 %) — мужской пол. Кариотип с моносомией по X-хромосоме корректно отнести в отдельную группу.

Однако при разделении абортусов на группы согласно выявляемой хромосомной патологии половые различия касались только абортусов, в кариотипе которых была выявлена какая-либо структурная перестройка. Все кариотипы со структурными перестройками были женского пола.

Мужского пола среди кариотипов с анеуплоидиями и полиплоидиями было меньше по сравнению с женским полом. Однако для окончательных выводов в дальнейшем необходимо накопление материала в каждой отдельно взятой группе хромосомной патологии. В наших исследованиях мозаичные кариотипы составили 7,6 % случаев общего числа аномальных кариотипов, хотя по данным других авторов [10, 11] этот показатель выше. Можно предположить, что он зависит от типа используемой для исследований ткани (эмбриональная или экстраэмбриональная) и от допустимых ошибок применяемых методов. Мозаичные кариотипы в основном обнаружены при полиплоидиях и в группе абортусов с моносомиями по X хромосоме.

Анализ двух групп женщин как с нормальным, так и аномальным кариотипом по частоте встречаемости АЭI и АЭII продемонстрировал преобладание такой патологии эмбрионального развития среди абортусов во II группе (16 случаев, 31,4 %) по сравнению с I группой (9 случаев, 14,3 %) ($p < 0,05$). Сопоставление типов хромосомных аномалий и типов нарушения эмбрионального развития показано в табл. 2. В I группе женщин с невынашиванием на долю АЭ с аномальным кариотипом приходится 15,3 %, тогда как во II группе абортусов

от стимулированных женщин с анэмбриониями было 37,0 % ($p < 0,05$) случаев. Причем среди беременностей, полученных методами ВРТ, у абортусов с АЭ 1/3 женщин имели полиплоидный кариотип (триплоидия, реже тетраплоидия). Напротив, в группе женщин с невынашиванием беременности ни одной АЭ с полиплоидным кариотипом обнаружено не было.

По результатам сравнения двух групп женщин можно сделать вывод, что стимулированные женщины, особенно с первичным бесплодием, нуждаются в более тщательном изучении их геномов перед лечением методами ВРТ. Очевидно, хромосомный дисбаланс — не единственный фактор, определяющий пролиферативный потенциал клеток развивающегося зародыша. Развитие организма — это работа всего генома с учетом полиморфизма генов, в частности генов детоксикации [15], эпигенетической наследственности, сегрегации в поколениях наследственных полиморфных вариантов хромосом и т.д. Эти факторы должны учитываться в такой же степени, как и другие этиологические факторы привычного невынашивания беременности и стерильности.

Выводы. Таким образом, проведенный в настоящем исследовании интерфазный FISH-анализ клеток ворсин хориона спонтанных абортусов и неразвивающихся беременностей в дополнение к стандартному цитогенетическому исследованию показал высокую эффективность (93,4 %). С помощью такого комплексного обследования была установлена частота хромосомной патологии (60,1 %) среди абортусов в I триместре беременности.

Частота аномальных кариотипов абортусов в группе женщин, забеременевших с помощью ВРТ, была несколько ниже (52,3 %) по сравнению с группой женщин с невынашиванием беременности (61,9 %). Обнаружены как типичные для абортусов этого периода развития хромосомные аномалии (анеуплоидии аутосом и половых хромосом, полиплоидии, структурные aberrации), так и редкие типы хромосомного дисбаланса, частота которых не превысила 5 %. Возможно, некоторые из этих трисомий имеют отношение не к эмбриону, а к клеткам плодных оболочек, и на более поздних этапах развития проявились бы как пла-

центарный мозаицизм. Однако этот вопрос требует более детального изучения.

Во II группе женщин с циклами индукции овуляции развитие эмбриона по типу АЭ проходило достоверно чаще ($p < 0,05$), чем в I группе женщин с невынашиванием беременности. Этим женщинам перед лечением методами ВРТ, кроме стандартного кариотипирования супругов, необходимо более детальное исследование геномов с применением современных методов молекулярной генетики.

Исследование кариотипа абортуса позволяет выявить носителей сбалансированных хромосомных перестроек среди родителей (абортус → родитель) и решить вопрос о выборе метода лечения бесплодия. Поэтому при обнаружении в абортивном материале структурной aberrации супругам необходимо рекомендовать кариотипирование.

Для профилактики хромосомной патологии у плода пациентам с привычным невынашиванием, у которых неоднократно обнаруживали аномальный кариотип абортуса, показано исследование гамет (FISH-метод) до беременности. В случае наступления беременности необходимо исследование бластомеров (метод предимплантационной генетической диагностики) или определение кариотипа плода методами инвазивной пренатальной диагностики.

SUMMARY. It is known that the frequency of chromosomal abnormalities among spontaneous miscarriages of the first trimester of pregnancy makes 50–60 %. Research of karyotypes of chorionic villus cells of miscarriages has been conducted by combining the standard cytogenetic method and the FISH analysis on interphase nuclei of centromeric specific DNA samples by the tests to the chromosomes 13/21, 14/22, 15, 16, 18, X, Y. The described complex approach can be successfully applied for effective identification of chromosomal abnormalities in the material of spontaneous miscarriages. The results specify the necessity of careful study of genomes of matrimonial pairs with the usual unmaturing in anamnesis and especially before treatment by IVF methods.

РЕЗЮМЕ. Відомо, що частота хромосомних аномалій серед спонтанних абортусів першого триместра вагітності складає 50–60 %. За допомогою поєднання стандартного цитогенетичного методу і FISH аналізу на інтерфазних ядрах з центромерспецифічними ДНК пробами до хромосом 13/21, 14/22, 15, 16, 18, X, Y проведено дослідження кариотипів некультивованих

клітин ворсин хоріону абортусів. Описаний комплексний підхід може бути успішно використаний для ефективної ідентифікації хромосомних аномалій в матеріалі спонтанних абортусів. Отримані результати указують на необхідність ретельного вивчення геномів подружніх пар із звичним невиношуванням в анамнезі, а особливо перед лікуванням допоміжними репродуктивними технологіями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Экстраэмбриональные и околоплодные структуры при нормальной и осложненной беременности* / Под. ред. В.Е. Радзинского. — М., 2004. — 393 с.
2. *Boue J., Boue A., Lazar P.* Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions // *Teratology*. — 1975. — 12, № 1. — P. 11–26.
3. *Kalousek D.K., Barrett I.J., Gartner A.B.* Spontaneous abortions and confined placental mosaicism // *Hum. Genet.* — 1992. — 88. — P. 642–646.
4. *Be C.R., Velasquez J., Youlton R.R.* A cytogenetic study in 609 abortion // *Rev. Med. Chile*. — 1997. — 125. — P. 317–322.
5. *Hoshi N., Hanatani K., Kishida T.* A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions // *Ann. Hum. Genet.* — 1980. — 44, № 2. — P. 151–178.
6. *Медицинские лабораторные технологии* : Справочник. В 2-х т. / Под. ред. А.И. Карпищенко. — СПб, 1999. — 660 с.
7. *Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И.* Хромосомы человека : Атлас. — М.: Медицина, 1982. — 260 с.
8. *Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Brusquant D., Carles E., Roizes G.* Two new cases of the Christchurch (Ch1) chromosome 21: evidence for clinical consequences of de novo deletion 21p- // *Цитология и генетика*. — 2002. — 36, № 1. — С. 46–49.
9. *Soloviev I.V., Yurov Yu.B., Ioannou P., Georghion A., Hadjimarcou M., Patsalis P., Roizes G., Sharonin V.O., Kravets V.S., Vorsanova S.G.* Identification and molecular-cytogenetic characterization of large subset of human plasmids, cosmids, PAC and YAC clones: the search of DNA probes for pre- and postnatal diagnosis // *Čs. Pediat.* — 1997. — 52, № 7. — P. 529–538.
10. *Лебедев И.Н., Островерхова Н.В., Никитина Т.В., Суханова Н.Н., Назаренко С.А.* Молекулярно-цитогенетическая характеристика хромосомного дисбаланса в клетках спонтанных абортусов человека с низкой пролиферативной активностью in vitro // *Генетика человека*. — 2003. — 39, № 8. — С. 1111–1122.
11. *Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н.* Хромосомные синдромы и аномалии. Классификация и номенклатура. — Ростов-на-Дону, 1999. — С. 107–112.
12. *Кузнецова Т.В., Баранов В.С.* Современные цитогенетические подходы к пренатальной диагностике // *Современные методы диагностики наследственных болезней* : Материалы науч.-практ. конф. — М., 2001 г.
13. *Griffin D.K., Millie E.A., Redline R.W. et al.* Cytogenetic analysis of spontaneous abortions : Comparison of techniques and assessment of the incidence of confined placental mosaicism // *Amer. J. Med. Genet.* — 1997. — 72. — P. 297–301.
14. *Baranova H. et al.* Possible involvement of arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 genes in the development of endometriosis // *Mol. Hum. Reprod.* — 1999. — 5(7). — P. 636–641.
15. *Tho S.P.T., Byrd J.R., McDonough P.G.* Etiologies and subsequent reproductive performance of 100 couples with recurrent abortion // *Fertil. and Steril.* — 1979. — 32. — P. 389–395.
16. *Колотий А.Д., Ворсанова С.Г., Кириллова Е.А., Юров И.Ю., Монахов В.В., Берешева А.К., Юров Ю.Б.* Роль многоцветной интерфазной флюоресцентной гибридизации in situ (mFISH) в идентификации численных хромосомных аномалий в материале спонтанных абортусов // *Медицинская генетика* : Материалы V съезда Рос. об-ва мед. генетиков. — 2005. — 4, № 5. — С. 207.

Поступила 09.12.05