

Кудрявцева Е.В.<sup>1</sup>, Ковалев В.В.<sup>1</sup>, Канивец И.В.<sup>2</sup>, Коростелев С.А.<sup>2</sup>

## Современные возможности выявления хромосомных аномалий в abortивном материале

1 – УГМУ, кафедра акушерства и гинекологии ФПК и ПП, г. Екатеринбург; 2 – Медико-генетический центр «Геномед», г. Москва

Kudryavtseva E.V., Kovalev V.V., Kanivets I.V., Korostelev S.A.

### Modern abilities to detect chromosomal abnormalities in the abortive material

#### Резюме

Целью работы явилось определение структуры хромосомных перестроек abortивном материале, полученном при невынашивании беременности. Был проведен хромосомный микроматричный анализ abortивного материала от 525 женщин с невынашиванием беременности в сроке до 12 недель. Представлена структура выявленной хромосомной патологии у abortивусов. Частота хромосомных aberrаций при исследовании abortивного материала составила 56,71%. Наиболее часто встречались анеуплоидии аутосом (60% среди всех выявленных хромосомных aberrаций). Значительное число хромосомных аномалий составили структурные перестройки (7,27%), которые чаще всего не определяются при стандартном исследовании кариотипа. Хромосомный микроматричный анализ является информативным и доступным методом исследования и может быть рекомендован для широкого использования в клинической практике.

**Ключевые слова:** ХМА, молекулярное кариотипирование, невынашивание беременности, кариотип, хромосомные болезни

#### Summary

The aim of the work was to determine the structure of chromosome rearrangements in the abortive material obtained in miscarriage. CMA was carried out on abortive material, obtained from 525 women with miscarriage in up to 12 weeks. The structure of chromosomal pathology in abortions was identified. The frequency of chromosomal aberrations in the investigation of abortive material was 56.71%. The most common was aneuploidy of autosomes (60% of all identified chromosomal aberrations). A significant number of chromosomal abnormalities accounted for structural adjustment (7.27%), which usually not identified in the standard karyotype study. CMA is an informative and accessible method of investigation and can be recommended for routine use in clinical practice.

**Keywords:** CMA, miscarriage, molecular cytogenetic analysis, karyotype, chromosomal disease

#### Введение

Исследования последних 50 лет иллюстрируют существенную роль хромосомных aberrаций у эмбриона и плода в генезе невынашивания беременности. Доля хромосомных аномалий при невынашивании в первом триместре составляет 50-65%. При этом невынашивание беременности в ранние сроки является одним из самых частых осложнений гестации [1,2,3,4,5,9].

Несмотря на доказанную роль хромосомных aberrаций в генезе невынашивания беременности, исследование кариотипа эмбриона и плода при этой патологии проводится лишь спорадически. Это обусловлено рядом объективных и субъективных причин. Большинство хромосомных аномалий, приводящих к преждевременному завершению беременности, наследственно не обусловлены и являются «случайными». При этом не суще-

ствует методов эффективной профилактики подобных генетических нарушений при последующих беременностях. Классическое кариотипирование относится к дорогостоящим, трудновыполнимым с организационных позиций, технически сложным и не всегда эффективным исследованиям. При проведении данного исследования возникает ряд технических проблем: невозможна транспортировка материала из отдаленных регионов (ограничение по времени начала культивирования материала), часто возникает контаминация материнскими клетками, в значительной части случаев имеют место неудачи культивирования (по данным некоторых авторов при проведении цитогенетического исследования abortивного материала получить результат удается лишь в 73,6% случаев). При проведении цитогенетического анализа не определяются субмикроскопические структурные пере-

стройки, что приводит к ложноотрицательным результатам [3,4,5,6,7,8]. Поэтому в клинической практике бытует мнение о нецелесообразности исследования кариотипа в абортном материале.

На сегодняшний день вместо стандартного цитогенетического анализа есть возможность использовать хромосомный микроматричный анализ (ХМА). Это исследование имеет ряд преимуществ: возможна транспортировка материала (при температуре +2-+8 градусов допустимо хранение материала до 48 часов, при комнатной температуре допустима транспортировка в течение суток), определяется контаминация материнскими клетками (что значительно снижает риск ложноотрицательного результата), сокращены сроки проведения анализа, возможно выявление микроструктурных перестроек [4]. При этом выявление хромосомных аномалий у эмбриона, на наш взгляд, является целесообразным с практической точки зрения, поскольку позволяет оптимизировать алгоритм обследования супружеской пары после эпизода невынашивания. В некоторых случаях требуется обязательное исследование кариотипа родителей. В других случаях напротив, более целесообразно направить обследование на выявление гинекологических, а не генетических причин невынашивания. При использовании вспомогательных репродуктивных технологий при определении аномального хромосомного набора в абортном материале в будущем может быть рекомендована предимплантационная генетическая диагностика (ПГД), если же прерывание беременности произошло при нормальном хромосомном наборе, то при следующей попытке ЭКО следует принять другие меры для профилактики невынашивания.

Наиболее важным преимуществом хромосомного микроматричного анализа перед стандартным кариотипированием является высокое разрешение и возможность выявления микроструктурных перестроек. Такие перестройки могут быть следствием наличия хромосомных aberrаций у родителей, что будет приводить к повторению невынашивания. В некоторых случаях может потребоваться проведение вспомогательных репродуктивных технологий с применением ПГД или с использованием донорских гамет. Своевременное выявление аномального кариотипа у родителей может уберечь их от психотравмирующей ситуации, связанной с повторными случаями невынашивания беременности в будущем [4,8].

**Цель исследования:** установить долю нормального и патологического хромосомного набора при исследовании абортного материала при невынашивании беременности до 12 недель, определение структуры хромосомных перестроек, выявленных методом хромосомного микроматричного анализа.

## Материалы и методы

Исследован абортный материал, полученный в 525 случаях невынашивания беременности в сроке до 12 недель (срок беременности определен по УЗИ). Средний возраст пациенток составил  $33 \pm 5,3$  года. Исследование проводилось на базе медико-генетического центра «Геномед» в период с июля 2015 по октябрь 2016 гг. Абортный

материал доставлялся из различных городов России после процедуры вакуум-аспирации, либо выскабливания полости матки. Кариотип в абортном материале определялся методом хромосомного микроматричного анализа.

При проведении ХМА используется достаточно сложная технология, включающая выделение ДНК, ее амплификацию и дальнейшую энзиматическую рестрикцию. На полученные фрагменты далее наносится флюоресцентная метка. Каждый фрагмент имеет специфическую структуру и связывается с комплиментарным олигонуклеотидом расположенным в строго определенном участке микроматрицы, возникает свечение. По относительной интенсивности свечения участков микроматрицы при сканировании можно количественно определить число таких фрагментов.

Микроматрица – это твердый носитель небольшого размера с прикрепленными к нему в определенном порядке олигонуклеотидами или участками ДНК. Микроматрица, используемая для ХМА абортного материала содержит 180000 специфических маркеров. Разрешающая способность таргетного ХМА от 800 000 п.н. (в отдельных регионах от 500 000 п.н.).

## Результаты и обсуждение

Из 525 полученных образцов абортного материала в 40 (7,6%) случаях исследование провести не удалось из-за дефектов забора материала и невозможности идентифицировать генетический материал. Таким образом, хромосомный микроматричный анализ был проведен в 485 случаях.

В 210 (43,3%) случаях был определен нормальный кариотип. Хромосомные аномалии выявлены в 275 (56,71%) случаях, что согласуется с литературными данными. При этом средний возраст пациенток, у которых в абортном материале был определен нормальный кариотип составил 32,3 года, а в группе пациенток, в материале от которых был выявлен патологический кариотип – 34 года. Средний срок прерывания беременности в группе с нормальным кариотипом составил 7 недель 3 дня, а в группе с патологическим кариотипом 6 недель 1 день, из чего можно сделать вывод, что прерывание беременности при наличии аномального кариотипа эмбриона происходит чаще всего в более ранние сроки.

Структура выявленных хромосомных aberrаций представлена в таблице 1.

Среди выявленных хромосомных перестроек чаще всего встречались анеуплоидии аутосом – в 60% случаев. Основную долю составили трисомии (58,3%), среди моносомий аутосом встречались лишь моносомия 21 хромосомы и моносомия 18 хромосомы (соответственно 1,4 и 0,3%). Среди трисомий не половых хромосом наиболее часто встречались трисомия 16 и 22 хромосомы. При этом среди числовых перестроек аутосом значительное число случаев составили мозаичные формы – 18,1%.

15,63% случаев составили числовые аномалии половых хромосом. Среди них лидировала моносомия X-хромосомы (ее частота составила 13% от всех выявлен-

Таблица 1. Структура выявленных хромосомных aberrаций

Хромосомная перестройка	Число случаев, абс. (%)
<b>Анеуплоидии не половых хромосом</b>	<b>165 (60)</b>
Трисомия 1 хромосомы	0 (0)
Трисомия 2 хромосомы	5 (1,8)
Трисомия 3 хромосомы	1 (0,3)
Трисомия 4 хромосомы	6 (2,1)
Трисомия 5 хромосомы	2 (0,7)
Трисомия 6 хромосомы	4 (1,4)
Трисомия 7 хромосомы	7 (2,5)
Трисомия 8 хромосомы	5 (1,8)
Трисомия 9 хромосомы	5 (1,8)
Трисомия 10 хромосомы	1 (0,3)
Трисомия 11 хромосомы	1 (0,3)
Трисомия 12 хромосомы	1 (0,3)
Трисомия 13 хромосомы	6 (2,1)
Трисомия 14 хромосомы	6 (2,1)
Трисомия 15 хромосомы	19 (6,9)
Трисомия 16 хромосомы	43 (15,6)
Трисомия 17 хромосомы	2 (0,7)
Трисомия 18 хромосомы	5 (1,8)
Трисомия 19 хромосомы	1 (0,3)
Трисомия 20 хромосомы	4 (1,4)
Трисомия 21 хромосомы	13 (4,7)
Трисомия 22 хромосомы	23 (8,3)
Моносомия 21 хромосомы	4 (1,4)
Моносомия 18 хромосомы	1 (0,3)
<b>Анеуплоидии половых хромосом</b>	<b>43 (15,6)</b>
Синдром Тернера (моносомия X-хромосомы)	36 (13,0)
Синдром Клайнфельтера (дисомия X-хромосомы)	5 (1,8)
Трисомия X-хромосомы	2 (0,7)
Дисомия Y-хромосомы	0 (0)
<b>Множественные анеуплоидии</b>	<b>19 (6,9)</b>
<b>Триплоидия</b>	<b>27 (9,8)</b>
69,XXX	9 (3,27)
69,XXY	18 (6,54)
69,XYU	0 (0)
<b>Тетраплоидия</b>	<b>1 (0,3)</b>
<b>Структурные перестройки</b>	<b>20 (7,27)</b>
Итого	275 (100%)

ных хромосомных aberrаций). Согласно данным отечественной и зарубежной литературы, несмотря на то, что моносомия X совместима с живорождением, лишь 2% беременности с этой аномалией заканчиваются рождением ребенка с синдромом Тернера, в остальных случаях происходит регресс беременности или самопроизвольный выкидыш, как правило в первом триместре[5,6,7].

В 19 (6,9%) случаях отмечались множественные анеуплоидии, в том числе двойные и тройные трисомии, которые при живорождении практически не встречаются.

Триплоидия обнаружена в 27 (9,8%) образцов. Соотношение кариотипов 69,XXY и 69,XXX составило 2:1. Такие кариотипы могут быть обусловлены как дигинией, так и диандрией (материнским или отцовским происхождением дополнительного хромосомного набора). В случае триплоидии диандрогенетического происхождения формируется частичный пузырный занос. При сомнительных результатах гистологического исследования и подозрении на частичный пузырный занос, с помощью хромосомного микроматричного анализа можно уста-

новить происхождение дополнительного хромосомного набора, что помогает определить риск онкологических осложнений у женщины. При этом ни разу не был установлен кариотип 69,XYU (такой кариотип встречается только при диандрии). Это объясняется элиминацией эмбрионов с таким кариотипом до наступления беременности (предимплантационные потери) [1]. В 1 случае обнаружена тетраплоидия (кариотип 96,XXXU).

Особое внимание обращает на себя количество структурных перестроек. Оно составило 7,27% случаев. При этом большинство из них оказались меньшими по размеру, чем те, которые возможно было бы выявить при проведении стандартного кариотипирования. В отличие от числовых аномалий, которые чаще всего носят спорадический характер, структурные перестройки могут наследоваться от родителей (при наличии в кариотипе реципрокных транслокаций, Робертсоновских транслокаций, инсерций и инверсий). Обнаружение несбалансированной микроструктурной перестройки в абортивном материале является прямым показанием для обследо-

ния родителей. Хромосомный микроматричный анализ точно определяет размер выявленной перестройки, что позволяет подобрать оптимальный метод для исследования хромосомного набора супругов (цитогенетическое исследование или FISH-диагностика).

### Выводы

1. Учитывая высокую частоту хромосомных aberrаций при исследовании abortивного материала показано определение хромосомного набора эмбриона/плода с целью оптимизации алгоритма обследования супружеской пары при подготовке к следующей беременности.

2. Значительное количество хромосомных aberrаций составляют микроструктурные перестройки, кото-

рые не обнаруживаются при стандартном цитогенетическом исследовании.

3. Хромосомный микроматричный анализ является информативным и доступным методом исследования и может быть рекомендован для широкого использования в клинической практике. ■

*Кудрявцева Е.В., к.м.н., Ковалев В.В., проф., УГМУ, кафедра акушерства и гинекологии ФПК и ПП, г. Екатеринбург; Канивец И.В., проф. Коростелев С.А., Медико-генетический центр «Генамед», г. Москва; Автор, ответственный за переписку - Кудрявцева Елена Владимировна, 620109, Екатеринбург, ул. Токарей 27/2-87, elenavladpopova@yandex.ru*

### Литература:

1. *Наследственные болезни: национальное руководство / под ред. Н.П. Бочкова, Е.К. Гинтера, В.П. Пузырева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 936 с.*
2. *Hogge W. A. The Clinical Use of Karyotyping Spontaneous Abortions // Am. J. Obstet. Gynaecol. – 2003. – Vol. 189, No 2. – P. 397 - 402.*
3. *Chu Y., Wu D., Hou Q.F. et al. Application of array-based comparative genomic hybridization technique in genetic analysis of patients with spontaneous abortion // Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. – 2016. – №25;51(8). – p. 592-596.*
4. *Yuan H., Chen M., Deng X. et al. Application of chromosomal microarray analysis for a cohort of Chinese patients with spontaneous miscarriage // Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. – 2016. – №33(4). – p. 442-446.*
5. *Сидельникова В. М., Сухих Г. Т. Невынашивание беременности. Руководство для врачей. М.: МИА, – 2011. – 536 с.*
6. *Nagaishi M, Yamamoto T, Iinuma K. et al. Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan // J. Obstet. Gynaecol. Res. 2004. - Vol. 30. No 3. - P. 237-241.*
7. *Баранов В. С., Кузнецова Т. В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. – Санкт-Петербург. – Изд-во Н-Л., 2007. – С. 163-168, 254- 256.*
8. *Никитина Т.В., Кашиеварова А.А., Скрябин Н.А., Четкина Н.Н., Мельников А.А., Лебедев И.Н. Молекулярное кариотипирование (АСГН) как современный подход к исследованию причин невынашивания беременности // Медицинская генетика. – 2013. – Т.12, №1 (127). – с. 26-35.*
9. *Hardy K., Hardy P.J., Jacobs P.A., Lewallen K., Hassold T.J. Temporal changes in chromosome abnormalities in human spontaneous abortions: Results of 40 years of analysis // Am J Med Genet A.– 2016. –№170(10). – p. 2671-80.*