

УДК: 576.316+616.98]:618.3-06

DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2018.04.018>

## ВПЛИВ ЧИННИКІВ РІЗНОЇ ЕТІОЛОГІЇ У ВИНИКНЕННЯ ЗАВМИРАННЯ ВАГІТНОСТІ

*Лозинська М.Р., Прокопчук Н.М., Мікула М.І., Корінець Я.М., Олексюк О.Б.<sup>1</sup>*

*ДУ "Інститут спадкової патології НАМН України" (керівник - проф. Гнатейко О.З.)*

*<sup>1</sup> Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького*

*Кафедра громадського здоров'я факультету післядипломної освіти (зав. - проф. Любінець О.В.)*

### Реферат

**Мета.** Оцінити внесок чинників не генетичної і генетичної природи у виникнення завмирання вагітності на термінах менше і більше 12 тижнів гестації.

**Матеріал і методи.** Провели клінічні обстеження, аналіз генеалогічної інформації, лабораторні дослідження, зокрема, цитогенетичні, 43 подружніх пар (86 осіб) із завмиранням вагітності в анамнезі. На підставі аналізу медичної документації визначили спектр хромосомних аномалій в матеріалі замерлих вагітностей.

**Результати й обговорення.** У 79,1% подружніх пар завмирання вагітності виявляли на терміні вагітності <12 тижнів. Найбільш частою причиною завмирання вагітності не генетичної природи були інфекційні захворювання (TORCH-інфекції) - у 44,2% пацієнтів та професійні шкідливості - у 27,9% осіб. Патологію статевої сфери виявили у 16,3% пацієнтів. У 11,8% подружніх пар зі завмиранням вагітності на терміні вагітності <12 тижнів виявлено підвищений рівень вовчакового антикоагулянта. 11,8% родичів пацієнтів I ступеня спорідненості мали невиношування чи завмирання вагітності в анамнезі, або ж безпліддя >10 років. Хромосомні аномалії було виявлено у 4,7% подружніх пар, а в 9,5% подружніх пар підтверджено перичентричну інверсію хромосоми 9. У матеріалі замерлих вагітностей серед хромосомних аномалій зареєстровано переважання додаткових копій автосом і моносомію хромосоми X. Хромосомну патологію виявили на терміні менше 12 тижнів у 32,4% ембріонів і на терміні більше 12 тижнів - у 33,3% плодів.

**Висновок.** Дослідження ймовірних чинників ризику не генетичної і генетичної природи у подружніх пар зі завмиранням вагітності дозволяє прогнозувати можливі повторні репродукційні втрати.

**Ключові слова:** аномалії хромосом, завмирання вагітності, супутні захворювання, чинники ризику виникнення завмирання вагітності

### Abstract

CONTRIBUTION OF DIFFERENT ETIOLOGY FACTORS IN FADING PREGNANCY OCCURENCE

LOZYNSKA M.R., PROKOPCHUK N.M.,

MIKULA M.I., KORINETS Ja.M., OLEXIUK O.B.<sup>1</sup>  
State Institution "Institute of Hereditary Pathology, NAMS of Ukraine"

<sup>1</sup> The Danylo Halytsky National Medical University in Lviv

**Aim.** Evaluate the contribution of non-genetic and genetic factors to the occurrence of early intrauterine fetal death at the terms of less / more than 12 weeks of gestation.

**Material and Methods.** The clinical examinations, analysis of genealogical information and laboratory studies, in particular, cytogenetic analysis in 43 couples (86 patients) with history of early intrauterine fetal death were carried out. The spectrum of chromosomal abnormalities in the materials of early intrauterine fetal death was determined using the analysis of medical documentation.

**Results and Discussion.** Early intrauterine fetal death was detected in 79.1% of married couples at the terms of pregnancy <12 weeks. The most common cause of early intrauterine fetal death of not of genetic nature was infectious diseases (TORCH-infection) that found in 44.2% of patients and occupational hazards risk factors was detected in 27.9% persons. Pathology of the genital area was found in 16.3% of patients. In 11.8% of married couples with stopped pregnancy at the term of less than 12 weeks an elevated level of lupus anticoagulant was detected. Eleven point eight percents of I degree relatives of the patients had a history of miscarriage or early intrauterine fetal death, or infertility more than 10 years. Chromosomal abnormalities were detected in 4.7% of married couples. In 9.5% of married couples was confirmed pericentric inversion of chromosome 9. In the material of early intrauterine fetal death, the predominance of additional copies of autosomes and monosomal chromosome X among chromosomal abnormalities were registered. Chromosomal pathology was detected on a term of pregnancy less than 12 weeks in 32.4% of embryos and on a term of pregnancy more than 12 weeks - in 33.3% of fetus.

**Conclusion.** Investigation of probable risk factors of non-genetic and genetic nature in married couples with early intrauterine fetal death allows predicting possible repeated reproductive losses.

**Key words:** chromosomal anomalies, fading pregnancy, early intrauterine fetal death, concomitant diseases, the risk factors of fading pregnancy

### Вступ

Відтворення людини є надзвичайно неефек-

тивним - майже 70% запліднень не завершуються живонародженнями. Спонтанна анеуплоїдія плода є найпоширенішою причиною таких втрат, особливо в першому триместрі вагітності. Незважаючи на те, що загибель ембріона чи плода внаслідок анеуплоїдії *de novo* спостерігається з подібними частотами у жінок зі спорадичними та повторними втратами, у деяких пар з рецидивуючим завмиранням вагітності (ЗВ) виявляють додаткові асоційовані генетичні чинники, а в інших - порушення не генетичної етіології [1, 2]. Під час генетичного консультування подружніх пар із порушенням репродукційної функції при з'ясуванні причин виникнення ЗВ, а також при визначенні повторного ризику даної негативної події у родині провідна роль належить цитогенетичним дослідженням. Результати обстежень подружніх пар із репродукційними порушеннями свідчать про те, що частота хромосомних аномалій (ХА) у них може коливатися від 4,3 до 9,6%, а кожна восьма пара потребує цитогенетичного дослідження, тому що фенотипово здорові особи можуть бути носіями хромосомної перебудови, а в загальній популяції рівень ХА становить 0,5-3,0% [3-5]. Вірогідність ЗВ у середньому виникає з частотою 1 : 180 нормальних гестацій. За структурою викиднів, ЗВ домінує серед них і досягає 20% від усіх випадків переривань на різних термінах, причому більшість із вагітностей є планованими. Найчастішою причиною ЗВ на ранніх термінах є генетичні аномалії розвитку ембріонів: це майже 70% вагітностей, що не розвиваються до 6 тижнів, 50% - до 10 тижнів і 5% - після 12 тижнів вагітності. Всі інші причини (30% випадків) можуть бути присутніми одночасно [5, 6]. Чинниками, що різко підвищують вірогідність несприятливого завершення вагітності є: різкі гормональні коливання в материнському організмі, метаболічні розлади, хромосомні і генні аномалії плоду; гострі інфекційні захворювання будь-якої природи; хронічні інфекції, що особливо загострилися на тлі вагітності; шкідливі звички, застосування ліків, не дозволених під час вагітності,

всі анатомічні аномалії матки, ендокринні порушення, імунологічні чинники, фактори навколишнього середовища, якість сперми та вік матерів і батьків. Повторні репродукційні втрати (ПРВ) або рецидивний аборт є менш поширеними, що трапляються приблизно у однієї зі 100 вагітних жінок [7]. Існує низка доказів, що свідчать про не випадкові генетичні аберації у пари з повторними репродукційними втратами. По-перше, частота виявлення аномалій каріотипу у батьків, включаючи збалансовані транслокації, є вищою серед пар з ПРВ (2% - 5%), ніж у загальній популяції (0,2%). По-друге, поширеність ПРВ серед родичів I ступеня спорідненості у жінок збільшується приблизно у 6 разів порівняно з контролем. Стандартна оцінка ПРВ в даний час включає в себе тестування на хромосомні перебудови у кожного з батьків, а також обстеження матерів на ендокринну (щитоподібну), автоімунну (вовчаковий антикоагулянт і антифосфоліпідні антитіла) патологію, анатомічні (захворювання ендометрію або аномалії матки), а в окремих випадках, наприклад, на успадковані тромбофілії [8].

Метою роботи було оцінити внесок чинників не генетичної і генетичної природи у виникненні завмирання вагітності на термінах менше і більше 12 тижнів гестації.

### Матеріал і методи

Провели клінічні обстеження, аналіз генеалогічної інформації і лабораторні дослідження, зокрема, цитогенетичні, 43 подружніх пар (86 осіб) із завмиранням вагітності в анамнезі. Пацієнтів обстежували відповідно до протоколу надання медичної допомоги, затвердженого МОЗ України. Реєстрували хронічні і гострі інфекційні захворювання, супутню патологію статевої і не статевої сфер, професійні шкідливості та особливості каріотипу у осіб досліджуваної групи. Аналіз генеалогічної інформації проводився методом однічної реєстрації пацієнта з урахуванням етичних вимог при роботі з людиною. Для визначення спадкової обтяженості на репродукційні порушення проводились генеалогічні

дослідження. На підставі аналізу медичної документації визначили спектр хромосомних аномалій в матеріалі ЗВ в анамнезі.

Забір зразків крові і культивували клітин *in vitro* для цитогенетичних досліджень проводили в поживному середовищі RPMI з додаванням ФГА протягом 72 год у термостаті при  $t=37^{\circ}\text{C}$ . Для зупинки поділу клітин на стадії метафази до суміші додавали 10 мкг/мл розчину колхіцину, а для отримання кращої морфології хромосом - 100 мкг/мл розчину бромистого етидію. Суміш розчинів зі зразком ретельно збовтували та інкубували в термостаті при  $37^{\circ}\text{C}$ . Через 1,5 год. виконували центрифугування клітин протягом 10 хв. при 1500 об/хв. Надосадову рідину відбирали, залишаючи 0,5 мл розчину із клітинами, додавали у пробірку по 7 мл гіпотонічного розчину хлористого калію (0,075 М) та інкубували в термостаті при  $37^{\circ}\text{C}$ . Через 50 хв. суспензію клітин центрифугували протягом 10 хв. при 1500 об/хв, відбирали супернатант і додавали 5 мл розчину охолодженого фіксатора - суміші етилового спирту і льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 3 : 1 і витримували 30 хв в холодильнику при 5 -  $8^{\circ}\text{C}$ . Маніпуляцію повторювали тричі. Потім надосадову рідину відбирали, а 0,5 мл суспензії клітин розкапували на попередньо охолоджене предметне скельце. Препарати фарбували диференціально з використанням барвника Романовського-Гімзи, розчиненого у фосфатному буфері (рН=6,8) і додавали 3-5 крапель 0,25%-го розчину трипсину. Аналіз проводили з використанням світлового мікроскопу із використанням рекомендацій ISCN [9]. Аналізували в кожному випадку від 20 у нормі до 35 мета-

фазних пластинок при виявленні патологічного клону клітин із якісною морфологією хромосом і диференційним забарвленням.

Статистичне опрацювання отриманих експериментальних даних проводилося зі застосуванням методів варіаційної статистики шляхом розрахунку медіани, середнього арифметичного (М) та стандартного відхилення (m) з урахуванням кількості спостережень.

### Результати й обговорення

Середній вік чоловіків досліджуваної групи становив  $31,0 \pm 0,6$  років (від 24 до 42 років), жінок  $25,5 \pm 0,7$  років (від 22 до 41 років), а загальний середній вік -  $29,8 \pm 0,5$  років. Серед обстежених подружніх пар одну ЗВ виявили у 29(67,4%) випадках, дві ЗВ - у 11(25,6%), три ЗВ - у 3(7,0%). Таким чином, найчастіше спостерігали один епізод ЗВ. У 34 (79,1%) пар завмирання виявляли на терміні вагітності <12 тижнів.

Провели реєстрацію хронічних і гострих інфекційних захворювань, супутніх захворювань статевої і не статевої сфер, а також та професійних шкідливостей у чоловіків і жінок досліджуваної групи. Результати спостереження наведено в табл. 1.

Результати, наведені в табл. 1, вказують на те, що найбільш частою причиною ЗВ не генетичної природи були інфекційні захворювання та професійні шкідливості. Серед інфекційних захворювань переважали TORCH-інфекції. За даними літератури найбільш небезпечними у випадках завмирання плода є такі інфекції як хламідіоз, герпес, чи токсоплазмоз [7]. Професійні шкідливості у обстежених пацієнтів частіше виявляли у випадках

Таблиця 1

Ймовірні чинники ризику, виявлені в обстежених подружніх пар із завмиранням вагітності в анамнезі, яким проведено каріотипування

Терміни завмирання вагітності	Інфекційні захворювання	Супровідна патологія		Професійні шкідливості
		статевої сфери	не статевої сфери	
<12 тижнів n=34	14(41,2%)	7(20,6%)	4(11,8%)	4(11,8%)
> 12 тижнів n=9	5(55,6%)	0	2(22,2%)	8(88,9%)
43	19(44,2%)	7(16,3%)	6(14,0%)	12(27,9%)

n - кількість подружніх пар

ЗВ на терміні > 12 тижнів. Співвідношення чоловіків і жінок, які професійно безпосередньо контактували з шкідливими чинниками переважно хімічної природи, становило 5:7, відповідно. Патологію статеві сфери частіше виявляли у жінок - кісту яєчника (2), ендометріоз (1), міому матки (1) - у 4 осіб, порівняно з чоловіками - порушення сперматогенезу, олігозооспермію, варикоцеле - у 3 осіб при ЗВ на терміні <12 тижнів. Серед інших захворювань у жінок реєстрували автоімунні захворювання (гіпотиреоз - 1, зоб - 1), сечокам'яну хворобу (1), хронічний бронхіт (1), а в чоловіків - псоріаз, панкреатит, хронічний бронхіт. У 11,8% подружніх пар зі ЗВ на терміні <12 тижнів виявлено підвищений рівень вовчакового антикоагулянта (ВА). За даними літератури [10] збільшення ВА є однією з ознак розвитку антифосфоліпідного синдрому. При єдиній ЗВ синдром виявляють приблизно в 5% жінок, в той час як рецидиви загибелі плода характерні вже для 45% жінок із цим діагнозом. Синдром небезпечний із-за формування тромбозів маточних артерій і судин в плаценті, з приводу чого виникає хронічна гіпоксія і гіпотрофія у плода із-за нестачі молекул кисню.

У всіх пацієнтів із ЗВ в анамнезі проводили аналіз генеалогічної інформації для виявлення сімей з повторними репродукційними втратами. Результати дослідження наведено в табл. 2.

У одного пацієнта, який звернувся разом з дружиною з приводу ЗВ (анембріонія) було виявлено маркерну хромосому зі супутниками (каріотип: 47,XY,+mar). В іншому ви-

падку в подружжя з двома ЗВ в анамнезі у чоловіка виявлено структурну перебудову - збалансовану транслокацію між хромосомами 3 і 7 (каріотип: 46,XY,t(3;7)(q26;q34), яка може призводити до виникнення вроджених вад розвитку в потомства. Отже, у 2(4,7%) подружніх пар зареєстровано ХА. У 3 чоловіків досліджуваної групи, у дружин яких виявляли ЗВ на терміні > 12 тижнів, та в однієї жінки, виявляли перичентричну інверсію хромосоми 9 - inv(9)(p11;q12), яка вважається парафізіологічним варіантом норми. Таким чином, у 4(9,3%) подружніх пар підтверджено перичентричну інверсію хромосоми 9. У 5(11,6%) пацієнтів переважно зі ЗВ на терміні <12 тижнів родичі I ступеня спорідненості (мами, сестри) мали також репродукційні порушення в анамнезі: невиношування і ЗВ.

На підставі медичної документації вивчили спектр ХА в ембріонів / плодів при завмерлих вагітностях у залежності від терміну. Результати дослідження наведено в табл. 3.

Результати, представлені в табл. 3, свідчать про те, що серед ХА, виявлених в матеріалі завмерлих вагітностей, переважали анеуплоїдії - додаткові копії автосом, а також моносомії статевих хромосом, що узгоджується з даними літератури [2]. Трисомії автосом частіше реєстрували на терміні > 12 тижнів - у 33,3% випадків, а всі моносомії хромосом - на терміні <12 тижнів. У матеріалі завмерлих вагітностей виявлено лише моносомію статевої хромосоми X, причому в одному випадку - в мозаїчній формі в поєднанні з нормальним каріотипом.

Таблиця 2

Особливості метафазних хромосом, виявлені у подружніх пар зі завмиранням вагітності в анамнезі, яким проведено каріотипування і спадкова обтяженість на репродукційні порушення

Терміни завмирання вагітності	Хромосомна патологія у батьків		Інверсії		Репродукційні порушення у родичів пацієнтів I ступеню спорідненості
	чоловіки	жінки	чоловіки	жінки	
<12 тижнів n=34	2(5,9%)	0	0	0	4(11,8%)
> 12 тижнів n=9	0	0	3(33,3%)	1(11,1%)	1(11,1%)
Разом n=43	2(4,7%)	0	3(7,0%)	1(2,3%)	5(11,6%)

n - кількість подружніх пар

Таблиця 3

Спектр хромосомних аномалій в матеріалі завмерлих вагітностей в залежності від терміну

Терміни завмирання вагітності	Хромосомна патологія у ембріонів / плодів				
	трисомії автосом	моносомії статевих хромосом	поліплоїдії	транслокації	мозаїчні каріотипи
<12 тижнів n=34	4(11,8%)	4(11,8%)	1(2,9%)	1(2,9%)	1(2,9%)
> 12 тижнів n=9	3(33,3%)	0	0	0	0
Разом n=43	7(16,3%)	4(9,3%)	1(2,3%)	1(2,3%)	1(2,3%)

n - кількість подружніх пар

Загалом, хромосомна патологія у ембріонів / плодів у матеріалі завмерлих вагітностей на терміні <12 тижнів реєструвалась у 11 (32,4%) випадків і >12 тижнів - у 3 (33,3%) випадків. За даними літератури, в цілому, найбільш поширеними порушеннями каріотипу при ЗВ є трисомії автосом, моносомії хромосоми X і поліплоїдії [2]. Підтвердженням того, що повторні ЗВ є результатом випадкових не відновлюваних подій є те, що прогноз подальшої вагітності кращий у пар після анеуплоїдного потомства, ніж після еуплоїдного (з нормальним каріотипом) [11, 12].

Таким чином, дослідження чинників ризику не генетичної і генетичної природи у подружніх пар зі ЗВ дозволить прогнозувати можливі ПРВ у пацієнтів, носіїв хромосомних аномалій чи варіантів хромосом, особливо в поєднанні з іншою супутньою патологією. Генетичне тестування продуктів зачаття у пари, які зазнали двох або більше втрат, може допомогти визначити основну етіологію та консультувати пацієнтів стосовно прогнозу на наступну вагітність. Каріотипування подружніх пар із ЗВ дозволить виявити осіб з підвищеною вірогідністю розвитку анеуплоїдії плода. Це сприятиме наданню адекватної генетичної консультації і, при необхідності, проведенню пренатальної діагностики.

## Висновки

1. Загальний середній вік пацієнтів із завмиранням вагітності в анамнезі становив  $29,8 \pm 0,5$  років. У 79,1% подружніх пар завмирання виявляли на терміні вагітності <12 тижнів.
2. Найбільш частою причиною завмирання

вагітності не генетичної природи були інфекційні захворювання - у 44,2% пацієнтів та професійні шкідливості - у 27,9% осіб. Професійні шкідливості у обстежених пацієнтів частіше виявляли на терміні вагітності > 12 тижнів. Патологію статевої сфери зареєстрували у 16,3% пацієнтів, серед яких переважали жінки. У 11,8% подружніх пар зі завмиранням вагітності виявлено підвищений рівень вовчакового антикоагулянта на терміні вагітності <12 тижнів.

3. Хромосомні аномалії було виявлено у 4,7% пацієнтів із завмиранням вагітності. У 9,5% подружніх пар підтверджено інверсію хромосоми 9. 11,6% осіб родичів пацієнтів I ступеня спорідненості мали порушення репродукційної функції в анамнезі.

4. Загалом, хромосомна патологія у ембріонів / плодів у матеріалі завмерлих вагітностей на терміні <12 тижнів реєструвалась у 32,4% випадків і >12 тижнів - у 33,3% випадків. Трисомії автосом частіше реєстрували на терміні >12 тижнів - у 33,3% випадків, а всі моносомії хромосом - на терміні <12 тижнів. Серед хромосомних аномалій в матеріалі завмерлих вагітностей переважали анеуплоїдії - додаткові копії автосом, а також моносомія хромосоми X.

## Література

1. Hyde K, Schust D. Genetic Considerations in Recurrent Pregnancy Loss. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015, 5(3): a023119. doi: [10.1101/cshperspect.a023119]
2. Silver R, Branch D. Sporadic and Recurrent Pregnancy Loss. In: Clinical obstetrics: Eds.: Blackwell Publishing, The fetus & mother, Boston. 3rd ed (ed. Reece EA, Hobbins JC). 2007: 143-160.
3. Hontar YV, Il'in IE, Parnitskaja OI. The significance of cytogenetical investigation of married couples and

- abortus materials in the case of faded pregnancy. *Journals of Problems of Biology and Medicine*. 2014: 73-77. Ukrainian (Гонтарь ЮВ, Ильин ИЕ, Парницкая ОИ: Роль цитогенетического обследования семейной пары и абортивного материала при случае замершей беременности. *Вісн. проблем біології і медицини*, 2014: 73-77).
4. Hontar YV. Cytogenetic characteristics of different human's ontogenetic stages in ART. The dissertation thesis for the scientific degree of the candidate of biological sciences, specialty 03.00.15 - genetics, Kyiv, 2016: 174 p. Ukrainian (Гонтарь ЮВ. Дисертація "Цитогенетичні характеристики різних онтогенетичних етапів людини в рамках ДРТ", поданої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 - генетика, Київ, 2016: 174 с).
  5. Tavolkina LV, Baronova EV, Sopko NI. The most frequent chromosomal abnormalities in the karyotypes of the patients with reproductively disturbances. Ukrainian (Тавокина ЛВ, Баронова ЕВ, Сопко НИ. Наиболее часто встречающиеся хромосомные аномалии в кариотипах пациентов с репродуктивными нарушениями. *Цитология и генетика*, 2007: 48-55).
  6. <https://okeydoc.ru/prichiny-zamershej-beremennosti-factory-riska>.
  7. Blyth E. Guidelines for infertility counselling in different countries: Is there an emerging trend? *Human Reproduction*, 2012, 27, July 7: 2046-2057. <https://doi.org/10.1093/humrep/des112>
  8. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. *Fertil Steril* 2012, 98(5): 1103-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.048>
  9. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN-2016). Reprint of *Cytogenetic and Genome Research*, 2016, 149: 1-2.
  10. Stephenson M, Kutteh W. Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol*, 2007, 50: 132-145. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.048>
  11. Carp HJ. Recurrent miscarriage: Genetic factors and assessment of the embryo. *Isr Med Assoc J*, 2008, 1: 229-231. <http://www.taylorandfrancis.com>
  12. Regan L, Backos M, Rai R: The investigation and treatment of couples with recurrent first-trimester and second-trimester miscarriage. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG), London, 2011. Green-top Guideline No.