

РОЛЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ СЕМЕЙНОЙ ПАРЫ И АБОРТИВНОГО МАТЕРИАЛА ПРИ СЛУЧАЕ ЗАМЕРШЕЙ БЕРЕМЕННОСТИ

ООО «Медицинский центр ИГР (г. Киев)

Вступление. Замершая или неразвивающаяся беременность является достаточно частым явлением в практике современного врача гинеколога. Частота невынашивания беременности в популяции составляет 20%. В структуре невынашивания частота привычного выкидыша колеблется от 5% до 20%, а единичных случаев замирания беременности – 45–88,6% от числа самопроизвольных выкидышей на ранних сроках. [4] В настоящее время наибольший интерес вызывают генетические, иммунные, тромбофилические факторы, являющиеся наименее изученными. Тромбофилические факторы генетически детерминированы. К генетическим факторам относят хромосомные аномалии эмбриона или плода, образовавшиеся при слиянии двух родительских клеток с наличием несбалансированного хромосомного набора. При исследовании материала выкидышей большинство обнаруженных хромосомных нарушений имели количественную этиологию (95%). [5].

Чем меньше срок беременности на момент гибели плодного яйца, тем выше частота хромосомных aberrаций. При наличии хромосомных отклонений развитие эмбриона (эмбриогенез) невозможно или резко нарушено на ранних стадиях. Предполагают связь нарушений развития при хромосомных аномалиях с пониженной способностью клеток к делению. При этом возникает резкая десинхронизация процессов развития эмбриона, развития плаценты, индукции дифференцировки и миграции клеток.

Причины хромосомных нарушений:

- Сбой мейотического деления: случаи нерасхождения гомологичных хромосом, что приводит к появлению моносомии или трисомии. Нерасхождение хромосом в яйцеклетках и сперматозоидах может произойти в любом периоде мейотического деления.

- Аномальный процесс кроссинговера при мейотическом делении гамет (например, обмен участками негомологичных хромосом)

- Проблемы, возникающие при оплодотворении: случаи оплодотворения ооцита двумя сперматозоидами (диспермия), в результате возникает триплоидный эмбрион.

- Нарушения первых митотических делений: полная тетраплоидия, возникающая при первом

делении митоза, приводит к удвоению хромосом и отсутствию разделения цитоплазмы.

- Возникновение мозаицизма на этапе митотического деления эмбриона при ненормальном расхождении хромосом в клетках эмбриона, начиная со второго клеточного деления после образования зиготы [8].

Группа пациентов, которые имеют в своем анамнезе репродуктивные потери, требуют индивидуального подхода, скорректированного консультирования и подбора наиболее эффективных мероприятий для избегания повторных самопроизвольных прерываний беременности, особенно если доминирующей причиной является генетический фактор.

Целью исследования явилось определение доли хромосомных отклонений в группе пациентов с репродуктивными потерями, а также установить численность нормального и патологического кариотипа при исследовании abortивного материала, что продемонстрирует роль хромосомной патологии в процессе остановки развития эмбриона.

Объект и методы исследования. Сбор первичной информации проводился на базе цитогенетической лаборатории ООО «Институт генетики репродукции» (директор – к. мед. н., И. Е. Ильин) и ООО «Медицинский центр ИГР» (директор – к. мед. н., Парницкая О. И.) в период с 2009 по 2013 гг. Проведено кариотипирование 3548 пациентам, из них 862 пациента обратилось за цитогенетическим анализом по причине самопроизвольных или медицинских abortов в анамнезе. Также выполнялось цитогенетическое исследование abortивного материала в сроках 5-12 недель гестации (392 случая), который доставлялся в медицинский центр после процедуры выскабливания полости матки. При этом применялось стандартное кариотипирование клеток ворсин хориона, а в случае отсутствия митоза в исследуемом материале по желанию пациентов анализ выполнялся методом FISH (fluorescence in situ hybridization).

Кровь пациентов для цитогенетического анализа получали путем пункции локтевой вены, после чего цельную кровь добавляли к питательной среде (PBmax, производитель Gibco). Культивирование проводилось при температуре +37°C в течении 72 часов. Для накопления лимфоцитов в стадии

метафазы вводился колхицин. По окончании культивирования клетки с питательной средой центрифугировались и полученный осадок подвергался гипотонической обработке 0,075М раствором хлорида калия до 20 минут при температуре +37°C. Затем клетки фиксировались в трёх сменах охлажденной +4°C смеси этанол-уксусная кислота в соотношении 3:1, приготовленной *ex tempore* (перед использованием). После окончательного центрифугирования и удаления супернатанта, суспензия клеток раскапывалась на охлажденные влажные стекла и высушивалась на воздухе. Окрашивание препаратов проводилось GTG-методом. [3] Для каждого пациента анализировалось 15-30 метафазных пластинок с разрешением 550 сегментов на гаплоидный набор. [3]

Для цитогенетического анализа абортуса применялся прямой метод приготовления препаратов (без предварительного культивирования на питательных средах). Для проведения исследования необходимо 15-30 мг ворсин хориона. Ворсины помещались в чашки Петри диаметром 22мм, которые были наполнены 2 мл гипотонического раствора (1,0% р-р цитрата натрия). Также к объему добавлялся колхицин из расчета 10 мкг/мл. Чашки помещались в термостат при температуре +37°C на 2-3 часа. Затем отбирался гипотонический раствор и по каплям добавлялся фиксатор (этанол-уксусная кислота в соотношении 3:1) при комнатной температуре, экспозиция 10 минут. Повторялась смена фиксатора 2 раза. Далее чашку помещали в холодильник при температуре +4°C как минимум на 18 часов. Через 18 часов отбирали фиксатор, к ворсинкам добавляли 60,0% р-р уксусной кислоты при комнатной температуре, экспозиция 10 минут. При этом происходит мацерация и выделение клеток. Суспензию переносили на предметное стекло и покачиваями равномерно распределяли клетки по стеклу, предварительно подогретому до +37°C. После высыхания суспензии просушивали препарат и окрашивали рутинной равномерной окраской или GTG-методом. [2].

При потребности проведения молекулярно-цитогенетического исследования использовались препараты, приготовленные для стандартного кариотипирования. Предварительно проводилась предгибридизационная подготовка препарата и наносились пробы CEP 18/X/Y и LSI 13/21 на заранее отмеченные зоны гибридизации. Стекло с нанесенными зондами помещалось в гибридизатор с установленной программой денатурации и гибридизации при +37°C длительностью от 4 до 12 часов. Затем для удаления негибридизовавшихся проб, а также с целью уменьшения кросс-гибридизации альфоидных последовательностей с центромерными участками других хромосом, стекла подвергаются отмывке. Далее препараты окрашиваются и проводится детекция флуоресцентных сигналов согласно стандартному протоколу. Микроскопический анализ осуществляется с использованием флуоресцентного микроскопа, оборудованного соответствующим

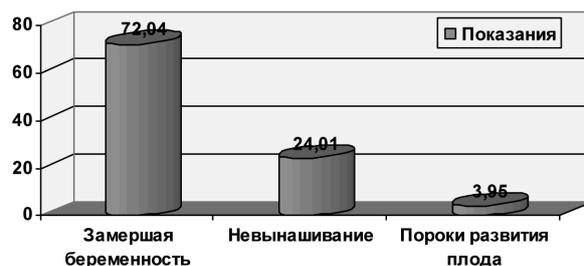


Рис. 1. Распределение показаний к кариотипированию.

набором фильтров и программой автоматической обработки изображения, в данном случае программа ISIS (MetaSystems, Germany). Для выявления анеуплоидий и мозаицизма в клетках ворсин хориона проводился анализ 100 клеток. [7].

Результаты исследований и их обсуждение.

В данном исследовании учитывались результаты кариотипирования 862 пациентов, которые обратились за цитогенетическим анализом по причине самопроизвольных или медицинских абортов в анамнезе, и в 27,26% случаев (n=235) были выявлены отклонения кариотипа.

В зависимости от показаний к кариотипированию группа пациентов разделилась следующим образом: обследование при замершей беременности в анамнезе составило 72,04% (n=621); с проблемой невынашивания беременности обратились 24,01% (n=207) пациентов; при прерывании беременности по медицинским показаниям в связи с множественными пороками развития плода – 3,95% (n=34). Данные продемонстрированы на **рис. 1.**

Среди пациентов со случаями замирания беременности особенности в кариотипе были определены у 31,08% (n=193). Было установлено следующее распределение особенностей структуры и количества хромосом: транслокации (11,40%), инверсии (21,76%), варибельность гетерохроматинового района хромосом (33,16%), увеличение спутников и спутничных нитей акроцентрических хромосом (24,87%), мозаицизм (7,25%), несбалансированный кариотип (делеции, дупликации, маркеры) (2,59%).

В группе пациентов с привычным невынашиванием нарушения кариотипа были в 17,87% случаев (n=37) со следующим распределением: транслокации (24,32%), инверсии (16,22%), варибельность гетерохроматинового района хромосом (35,14%), увеличение спутников и спутничных нитей акроцентрических хромосом (16,22%), мозаицизм (10,81%).

Наиболее малочисленную группу пациентов данного исследования составили пациенты с прерыванием беременности по медицинским показаниям, а именно пороки развития плода. Доля кариотипов с отклонениями составила 14,70% (n=5). Разнообразие патологий невелико: варибельность гетерохроматинового района хромосом и увеличение спутников и спутничных нитей акроцентрических хромосом составило по 8,82%.

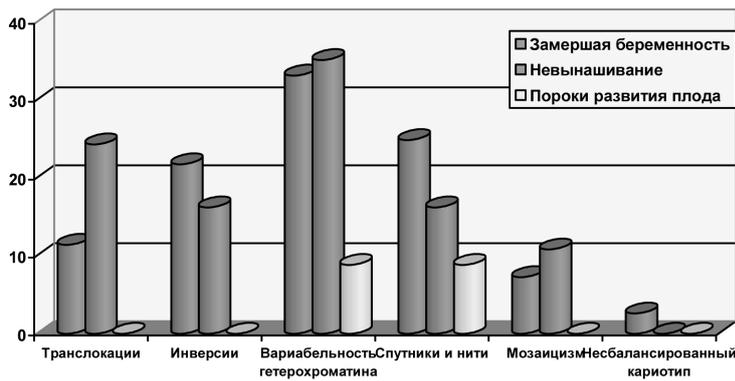


Рис. 2. Результаты кариотипирования в зависимости от показателей исследования.

Обобщенные данные по полученным результатам представлены на **рис. 2**.

Как демонстрирует сопоставление результатов, вариабельность размера гетерохроматиновых районов хромосом наиболее часто встречается в случаях патологии беременности. Хотя для носителей данных структурных хромосомных особенностей это считается вариантом нормы [9]. Но с точки зрения репродукции вариабельность размера гетерохроматиновых блоков, их положение на хромосоме, а также вариабельность размеров спутников и спутничных нитей акроцентрических хромосом, напрямую влияет на нерасхождение хромосом в мейозе при гаметогенезе, а также оказывает влияние на митотическое нерасхождение хромосом, что приводит к мозаичности развивающегося организма [10].

Для цитогенетического исследования abortивного материала поступило 392 образца, при этом стандартный кариотип был получен в 60,46% (n=237), результат с использованием молекулярно-цитогенетического метода (FISH) – 21,43% (n=84). В 18,11% случаев (n=71) результат не был получен в связи со спецификой исследованного материала. Как известно, самопроизвольное abortирование плодного яйца может наступать через некоторое время после замиранья. Этот период может составлять от нескольких дней до нескольких недель. В последнем случае ткани, что отбираются для кариотипирования (ворсины хориона), начинают отмирать, это ведет к отсутствию процесса деления, который необходим для получения полного кариотипа. Также невозможность получить результат напрямую зависит от незнания медицинского персонала о правильности сбора abortивного материала после выскабливания полости матки.

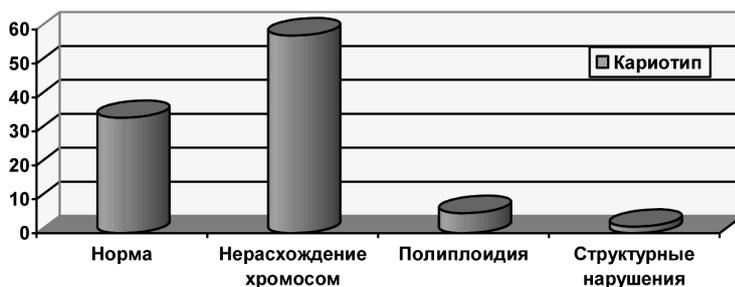


Рис. 3. Распределение результатов кариотипирования abortивного материала.

Вместе с тем, по результатам цитогенетического анализа был определен нормальный набор хромосом в 33,96% (n=109). Патологические кариотипы были представлены следующими аномалиями: нерасхождение хромосом (моносомии, трисомии и др.) в кариотипе abortуса составил 58,25% (n=187), полиплоидия (триплоидия, тетраплоидия) – 5,92% (n=19), несбалансированные структурные хромосомные нарушения – 1,87% (n=6). Данные представлены на **рис. 3**.

Как показывают результаты цитогенетического анализа, в 66,04% случаев замирание и abortирование плода было следствием хромосомных нарушений. Замирание плода при нормальном кариотипе может быть вызвано различными тератогенными воздействиями, провоцирующими точечные генные мутации, нарушением формирования внезародышевых органов (хорион, плодные оболочки), дисбаланс гормонов беременной женщины, иммунологические факторы, физиологические особенности эндометрия матки, физическое здоровье женщины, наличие острых инфекционных заболеваний [3].

Выводы. В теперешней системе медицинского консультирования Украины как и 20 лет назад основными причинами замиранья беременности считаются инфекции и гормональный сбой беременной женщины. Несмотря на высокую встречаемость хромосомной патологии abortусов, лишь небольшая часть материала направляется врачами акушерами-гинекологами на цитогенетическое исследование. Также доктора редко рекомендуют кариотипирование семейной паре с репродуктивными потерями, так как не видят ассоциации между случившемся выкидышем и хромосомным набором. Но важность цитогенетических анализов нельзя недооценивать, так как в некоторых случаях получить биологически сродное потомство возможно только с помощью вспомогательных репродуктивных технологий. В условиях прогрессирования репродуктивных нарушений необходимо преобразовать схему консультирования при первичном и вторичном бесплодии, при этом учитывать не только физиологическое состояние пациентов, но и их генетический статус. Зная кариотип и информацию о носительстве характерных для нашего этноса мутациях, можно создать наиболее эффективную

и индивидуальную программу лечения фертильных нарушений [6].

Перспективы дальнейших исследований.

Семейные пары с репродуктивными потерями составляют численную группу среди пациентов с вторичным бесплодием. Современные методы вспомогательных репродуктивных технологий и цитогенетики позволяют проводить исследование эмбрионов до переноса в полость матки. Преимплантационный генетический скрининг направлен на селекцию эуплоидных (нормальных) эмбрионов

прежде всего по наиболее частым хромосомным патологиям (13, 18, 21, X, Y). Соответственно, вышеупомянутое исследование снижает риск хромосомной патологии плода и самопроизвольного прерывания беременности, а также является необходимым мероприятием в помощи семейным парам с репродуктивными потерями. Преимплантационное исследование эмбрионов позволит сопоставить уровень нерасхождения хромосом в эмбрионах доимплантационного периода и кариотипа плода фактически полученных беременностей.

Литература

1. Ворсанова С. Г. Хромосомные синдромы и аномалии / С. Г. Ворсанова Ю. Б. Юров, В. Н. Чернышов. – Ростов-на Дону, 1999. – С. 155-156.
2. Зерова-Любимова Т. Е. Стандарты анализа препаратов хромосом человека (методические рекомендации) / Т. Е. Зерова-Любимова, Н. Г. Горovenko. – К., 2003. – С. 10, 16-18.
3. Радзинский В. Е. Экстраэмбриональные и околоплодные структуры при нормальной и осложненной беременности / В. Е. Радзинский, А. П. Милованов. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – С. 33-48
4. Сидельникова В. М. Привычная потеря беременности / В. М. Сидельникова – М.: Триада-Х, 2004. – 304 с.
5. Bricker L. Types of pregnancy loss in recurrent miscarriage: implications for research and clinical practice / L. Bricker., R. Farquharson // Hum. Reprod. – 2002. – Vol. 17, №5. – P. 1345–1350.
6. Gersen S. L. The principles of clinical Cytogenetics / Steven L. Gersen, Martha B. Keagle. – New York : Springer, 2013. – P. 275-292.
7. Gosden J. R. Chromosome analysis protocols / John R. Gosden. – Totowa, NJ 07512 : Humana Press, 2010 – P. 449-478.
8. McKinlay Gardner R. J. Chromosome abnormalities and genetic counseling / R. J. McKinlay Gardner, L. G. Shaffer, G. R. Sutherland. – New York : Oxford University Press, Inc., 2012. – P. 377–402.
9. Shaffer L. G. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature / L. G. Shaffer, J. McGowan-Jordan, M. Schmid. – Basel : Karger, 2013. – P. 140.
10. Wayandt H. E. Human Chromosome Variation: Heteromorphism and Polymorphism / Herman E. Wayandt, Vijay S. Tonk. – New York : Springer, 2013. – P. 140.

УДК 575

РОЛЬ ЦИТОГЕНЕТИЧНОГО ОБСТЕЖЕННЯ ПОДРУЖНИХ ПАР І АБОРТИВНОГО МАТЕРІАЛУ У ВИПАДКАХ ЗАВМЕРЛОЇ ВАГІТНОСТІ

Гонтар Ю. В., Ільїн І. Є., Парницька О. І.

Резюме. Дослідження присвячене проблемі репродуктивних втрат та ролі генетичної складової цієї проблеми. Як відомо, частота невиношування вагітності у популяції складає близько 20%, при цьому доля кількісних хромосомних порушень серед усіх виявлених складає 95%. Проаналізувавши данні пацієнтів, яким було рекомендоване каріотипування через замирання вагітності, були виявлені особливості каріотипу у 27,26% випадків. При цитогенетичному аналізі абортівного матеріалу хромосомні аномалії були визначені в 66,04% зразків. Тому у зв'язку з високою частотою хромосомних порушень у подружніх пар, що мали в анамнезі випадки замерлих вагітностей, а також у зразках абортів, дана група пацієнтів потребує індивідуальний підбір тактики лікування та виборі додаткових методів діагностики з використанням допоміжних репродуктивних технологій, а саме преімплантационного скринінгу на виявлення найбільш частих анеуплоїдів.

Ключові слова: каріотип, замерла вагітність, невиношування, хромосомні порушення.

УДК 575

РОЛЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ СЕМЕЙНОЙ ПАРЫ И АБОРТИВНОГО МАТЕРИАЛА ПРИ СЛУЧАЕ ЗАМЕРШЕЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Гонтарь Ю. В., Ильин И. Е., Парницкая О. И.

Резюме. Статья посвящена проблеме репродуктивных потерь и роли генетической составляющей этой проблемы. Как известно, частота невынашивания беременности в популяции составляет 20%, при этом доля количественных хромосомных нарушений среди всех обнаруженных составляет 95%. Проанализировав данные пациентов, которым было назначено каріотипирование по причине замирання беременности, были выявлены особенности в каріотипе в 27,26% случаев. При цитогенетическом анализе абортівного материала хромосомные аномалии были определены в 66,04% образцов. Поэтому в связи с высокой частотой хромосомных нарушений у семейных пар, имевших в анамнезе случаи замерших беременностей, а также в образцах абортів, данная группа пациентов нуждается в индивидуальном подборе тактики

лечения и выборе дополнительных методов диагностики с использованием вспомогательных репродуктивных технологий, а именно преимплантационного скрининга эмбрионов для выявления наиболее частых анеуплоидий.

Ключевые слова: кариотип, замершая беременность, невынашивание, хромосомные нарушения.

UDC 575

**The Role of the Cytogenetic Examination of Couples and Abortive Material in Case of Missed Abortion
Gontar J., Ilyin I., Parnitskaya O.**

Abstract. The article deals with reproductive losses and the role of the genetic component of this problem. As we know, the frequency of miscarriage in the population amounts to 20%. Currently, the greatest interest is genetic, immune, thrombophilic factors, which are the least understood. Genetic factors are chromosomal abnormalities of the embryo or fetus formed at the confluence of two parent cells with the presence of an unbalanced chromosome set. Group of patients who have in their anamnesis the reproductive losses require an individual approach, adjusted counseling and selection of the most effective measures to avoid repeated spontaneous abortions, especially if the dominant cause is the genetic factor. The aim of this study is determine the proportion of chromosomal abnormalities in patients with reproductive losses, as well as to establish the number of normal and abnormal karyotype in the study of abortive material that demonstrate the role of chromosomal aberrations in the process of stopping the development of the embryo.

Primary data collection was held on the basis of cytogenetic laboratory of "Institute of Genetics Reproduction" (director – Ilyin I., PhD) and "Medical Center IGR" (director – Parnitskaya O., PhD) in the period from 2009 to 2013. 862 patients were karyotyped for medical reasons by missed abortion. Also performed cytogenetic study of abortive material in terms of the 5-12 weeks of gestation (392 cases). For investigating of abortive material were selected chorionic villi. For the study of samples used a standard karyotyping or FISH (fluorescence in situ hybridization).

This study considered the results of karyotyping 862 patients who applied for cytogenetic analysis because of spontaneous abortion or medical history, and in 27. 26% of cases (n=235) were identified deviation of karyotype. Depending on the indications for karyotyping the group of patients was divided as follows: a survey with a history of missed abortion was 72,04% (n=621); patients with the problem of recurrent miscarriage – 24,01% (n=207); the abortion for medical reasons in connection with multiple malformations of the fetus – 3,95% (n=34). For cytogenetics of abortive material 392 samples received, wherein a standard karyotype was obtained in 60,46% (n=237), the result of using the method of molecular cytogenetic (FISH) – 21,43% (n=84). In 18. 11% of cases (n=71) the result was not obtained due to the specifics of the investigated material. On the results of cytogenetic analysis was determined a normal set of chromosomes in 33,96% (n=109). Abnormal karyotypes were represented by the following anomalies: chromosomal nondisjunction (monosomy, trisomy, etc.) in the karyotype abortions amounted to 58,25% (n=187), polyploidy (triploidy, tetraploids) – 5,92% (n=19), unbalanced structural chromosomal abnormalities – 1,87% (n=6). As the results of cytogenetic analysis in 66, 04% of aborting the fetus was a consequence of chromosomal abnormalities. Missed fetus with normal karyotype can be caused by a variety of teratogenic effects, provoking point mutations, impaired formation of extraembryonic (chorion, fetal membranes), hormone imbalance of the pregnant woman, the immunological factors, physiological characteristics of the uterine endometrium, the physical health of the woman, the presence of acute infectious diseases. But the importance of cytogenetic analysis can not be underestimated. Since in some cases produce biologically akin offspring is only possible through assisted reproductive technologies. In the conditions progression of reproductive disorders we need to convert scheme of counseling in primary and secondary infertility, while considering not only the physiological condition of the patients, but also their genetic status. The high frequency of chromosomal abnormalities among patients with fertility requires more attention from doctors of reproductive medicine. Peripheral blood cells' karyotyping appears to be one of the most important steps in couple's examination held before their entrance the in vitro fertilization program. This test is crucial for the calculation of risk of chromosomally abnormal child conceiving and subsequent choice of the most appropriate treatment approach involving additional diagnostic methods, e. g. preimplantation genetic diagnosis. This procedure allows to avoid the embryotransfer of aneuploid or chromosomally unbalanced embryos into the uterus what is extremely helpful in case of one of the parents is a carrier of balanced chromosomal aberrations or other abnormality. Knowing karyotype and information about the carriers of specific mutations for our ethnic group, we can create the most effective and individual treatment for fertile disorders.

Key words: karyotype, missed abortion, miscarriage, chromosomal abnormalities.

Рецензент – проф. Громова А. М.

Стаття надійшла 13. 03. 2014 р.