

## ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 618.3-076.5:575.08

Волков А.Н.<sup>1,2</sup>, Рытенкова О.И.<sup>3</sup>, Бабарыкина Т.А.<sup>3</sup>, Лысенко Д.И.<sup>3</sup>

### ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ ПРИ НЕРАЗВИВАЮЩЕЙСЯ БЕРЕМЕННОСТИ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 650029, Кемерово, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650043, Кемерово, Россия;

<sup>3</sup>ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница», 650000, Кемерово, Россия

*Цель исследования — изучение качественных и количественных характеристик хромосомных аномалий у абортусов при неразвивающейся беременности. Проведен цитогенетический анализ эмбрионального материала, полученного после искусственного прерывания неразвивающейся беременности у 57 женщин. Доля аномальных кариотипов составила 67,3%. Среди хромосомных нарушений преобладали числовые аномалии, структурные изменения хромосом встречались значительно реже. Цитогенетическое исследование абортного материала может стать ценным диагностическим инструментом, позволяющим установить роль генетических факторов в прекращении развития беременности как в случаях естественного зачатия, так и при использовании ВРТ.*

**Ключевые слова:** неразвивающаяся беременность; цитогенетический анализ; хромосомные аномалии.

**Для цитирования:** Волков А.Н., Рытенкова О.И., Бабарыкина Т.А., Лысенко Д.И. Цитогенетическая диагностика хромосомных аномалий при неразвивающейся беременности. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(9): 553-556. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-553-556>

*Volkov A.N.<sup>1,2</sup>, Rytenkova O.I.<sup>3</sup>, Babarykina T.A.<sup>3</sup>, Lysenko D.I.<sup>3</sup>*

#### THE CYTOGENETIC DIAGNOSTIC OF CHROMOSOME ANOMALIES UNDER NON-DEVELOPING PREGNANCY

<sup>1</sup>The Kemerovskii state medical university of Minzdrav of Russia, 650029 Kemerovo, Russia

<sup>2</sup>The Kemerovskii state university, 650043 Kemerovo, Russia

<sup>3</sup>The Kemerovskaia oblast clinical hospital, 650000 Kemerovo, Russia

*The purpose of the study is to analyze qualitative and quantitative characteristics of chromosome anomalies in abortus under undeveloped pregnancy. The cytogenetic analysis was implemented concerning embryonic material obtained after artificial abortion of undeveloped pregnancy in 57 women. The percentage of abnormal karyotypes made up to 67.3%. The number abnormalities prevailed among chromosome disorders. The structural alterations of chromosomes occurred significantly rarely. The cytogenetic analysis of abortion material can become a valuable diagnostic tool permitting to establish the role of genetic factors in termination of pregnancy both in cases of natural conception and application of ART.*

**Key words:** undeveloped pregnancy; cytogenetic analysis; chromosome anomalies.

**For citation:** Volkov A.N., Rytenkova O.I., Babarykina T.A., Lysenko D.I. The cytogenetic diagnostic of chromosome anomalies under non-developing pregnancy. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (9): 553-556. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-553-556>

**For correspondence:** Volkov A.N., candidate of biological sciences, senior researcher, associate professor of the chair of genetics. e-mail: [volkov\\_alex@rambler.ru](mailto:volkov_alex@rambler.ru)

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 13.04.2017

Accepted 15.04.2017

Неразвивающаяся, или замершая беременность (НБ) — одна из распространённых причин потери плода; она составляет существенную долю в общем спектре патологий беременности. Частота НБ в различных популяционных группах обычно рассчитывается на

основании анализа клинических признаков наступления и прекращения беременности. В таком случае эта величина приблизительно оценивается в 15—25% [1]. В действительности этот показатель существенно выше за счёт нераспознанных ранних потерь беременности. Так, в исследовании N. Elish и соавт. (1996) установлено, что 17,4% случаев успешного зачатия самопроизвольно разрешаются потерей беременности в течение 2 нед. [2]. В дальнейшем еще 13,7% клинически подтверждённых беременностей заканчиваются спонтан-

**Для корреспонденции:** Волков Алексей Николаевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ЦНИЛ ФГБОУ ВО КемГМУ, доц. каф. генетики ФГБОУ ВО КемГУ; e-mail: [volkov\\_alex@rambler.ru](mailto:volkov_alex@rambler.ru)

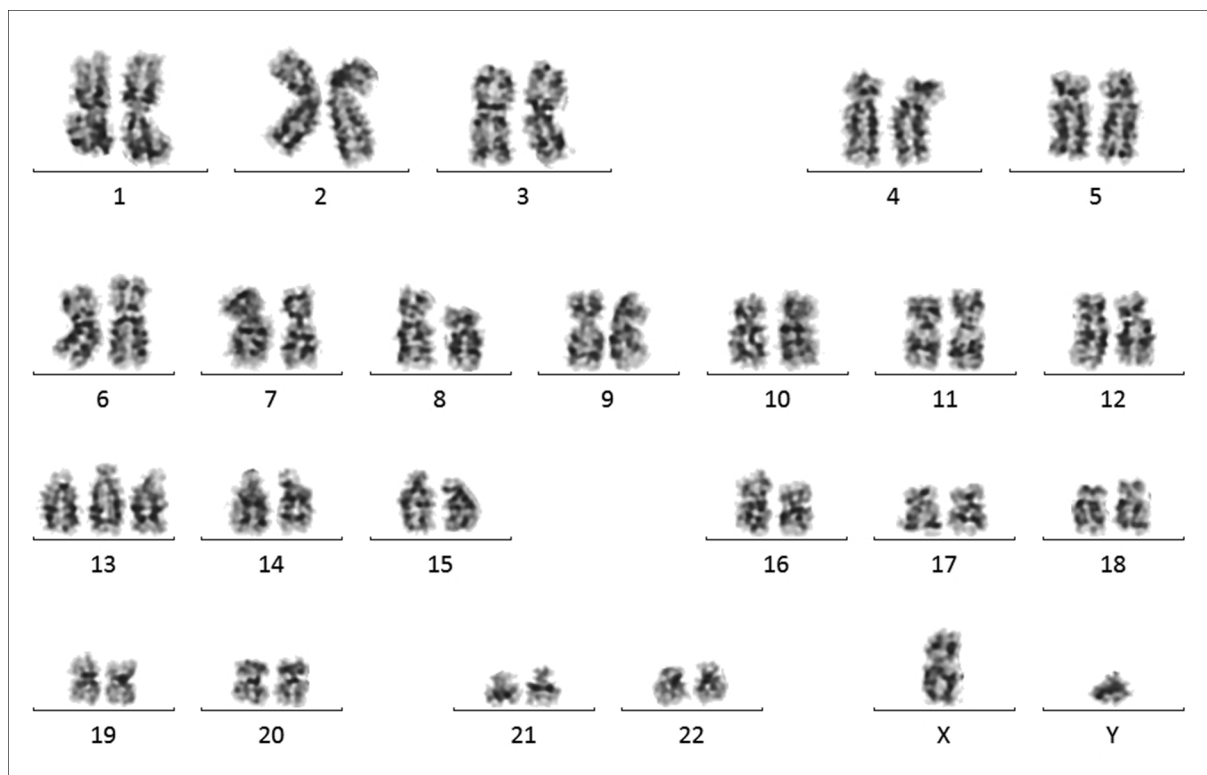


Рис. 1. Мужской кариотип эмбриона с трисомией по хромосоме 13 (47,XY,+13).

ным абортom до 16-й недели беременности [2]. Таким образом, на ранних стадиях беременности происходит жёсткий естественный отбор эмбрионов, в том числе и с позиции их генетических качеств.

Вклад генетических аномалий в нарушение развития эмбриона считается высоким. По разным данным, до 70% беременностей, прекративших развитие на 6—8-й неделе, несли эмбрион с различными хромосомными аномалиями [3, 4]. Изучение кариотипа эмбрионов при НБ имеет важное практическое значение, так как позволяет определить причины патологии беременности в каждом клиническом случае. Кроме того, такие исследования позволяют оценить уровень хромосомного мутагенеза у ранних эмбрионов и его вклад в общую картину репродуктивных потерь у населения.

Цель исследования — изучение качественных и количественных характеристик хромосомных аномалий у абортусов при неразвивающейся беременности.

**Материал и методы.** Для исследования были использованы образцы хориона и тканей эмбрионов, полученные при искусственном прерывании неразвивающейся беременности у 57 женщин, проживающих в Кемерово. Средний возраст женщин составил  $32,6 \pm 0,71$  года, а возрастной диапазон 24—43 года.

Биоматериал, помещённый в физиологический раствор с гепарином, доставлялся в цитогенетическую лабораторию медико-генетической консультации КОКБ (Кемерово). Все дальнейшие манипуляции вплоть до приготовления препаратов метафазных хромосом осуществлялись согласно имеющимся рекомендациям. Готовились «прямые» препараты без предварительного культивирования тканей [5]. Цитогенетический анализ дифференциально GTG-окрашенных хромосом выполнялся в соответствии с действующими требованиями [6] (рис. 1).

Статистический анализ осуществляли с использованием программы Statistica, v.5.5. Рассчитывались основные выборочные характеристики переменных (средние значения, пределы варьирования, доли) и стандартные ошибки средних значений.

**Результаты и обсуждение.** Прежде всего следует отметить, что общая результативность процедуры цитогенетического анализа клинического материала составила 91,2%, что сопоставимо с показателями, достигнутыми другими лабораториями [3, 4]. В 2 случаях качество доставленных образцов оказалось неудовлетворительным, дальнейшая работа с ними была нецелесообразна. В 3 случаях приготовленные цитогенетические препараты не содержали делящихся клеток. Это было связано с запоздалым выполнением медицинского аборта в сроке более 2 нед после замирания беременности. Таким образом, для эффективного цитогенетического анализа эмбрионального материала критическим является качество биоптата и своевременность выполнения соответствующих акушерских процедур.

Цитогенетический анализ абортного материала при замершей беременности показал, что 67,3% образцов содержат хромосомные аномалии. Сверхчисленные хромосомы или отсутствие хромосомы в какой-либо паре (анеуплоидии) отмечались в 51,9% случаев. В 11,5% образцов наблюдалось кратное увеличение числа гаплоидных хромосомных наборов (полиплоидии). Значительно реже (3,8% препаратов) образцы содержали хромосомные aberrации (рис. 2). Высокая доля аномальных кариотипов у спонтанных абортусов неоднократно выявлялась ранее и находилась в пределах 64—74,7% [3, 4, 7]. Учитывая это, можно говорить о значительном уровне хромосомного мутагенеза при формировании гамет и оплодотворении у человека как биологического вида.



Рис. 2. Доля хромосомных аномалий различного типа в биологических образцах при неразвивающейся беременности.

Очевидно, именно эти хромосомные аномалии становятся ведущей причиной прекращения развития беременности в ранние сроки.

Анализ спектра хромосомных нарушений в эмбриональном материале показал, что среди анеуплоидий наиболее часто встречается трисомия по 16 хромосоме (17,1% общего числа хромосомных нарушений) (см. таблицу). Кроме того, данная хромосома участвовала

#### Частота различных хромосомных аномалий при замершей беременности

Тип аномалии	Частота среди всех аномалий, n (%)
Простые анеуплоидии, в том числе:	24 (68,6)
47,XX,+16 и 47,XY,+16	6 (17,1)
45,X	3 (8,6)
47,XXY	2 (5,7)
47,XX,+2 и 47,XY,+2	2 (5,7)
47,XX,+8	2 (5,7)
47,XX,+13	2 (5,7)
47,XX,+3	1 (2,9)
47,XX,+6	1 (2,9)
47,XX,+7	1 (2,9)
47,XX,+15	1 (2,9)
47,XY,+18	1 (2,9)
47,XY,+21	1 (2,9)
47,XY,+22	1 (2,9)
Двойные анеуплоидии, в том числе:	3 (8,6)
48,XX,+16,+18	1 (2,9)
48,XY,+16,+20	1 (2,9)
48,XY,+16,+21	1 (2,9)
Полиплоидии, в том числе:	6 (17,1)
69,XXX и 69,XXY	5 (14,3)
92,XXYY	1 (2,9)
Хромосомные aberrации, в том числе:	2 (5,7)
mos47,XY,+mar[9]/46,XY[11]	1 (2,9)
46,XY,der(14)t(14;15)(p11;q22),mat	1 (2,9)

во всех выявленных нами двойных анеуплоидиях. Высокую распространённость трисомии 16 у спонтанных абортусов отмечали и в предыдущих исследованиях. Так, Р. Jacobs и Т. Hassold [8] обнаружили эту мутацию в 16,1% аномальных кариотипов, а О. Чиряева и соавт. [3] — в 14% таких образцов.

Часто у эмбриона выявлялся кариотип 45,X, который совместим с жизнью и ассоциирован с формированием синдрома Шерешевского—Тернера в постнатальном периоде. При этом характер и степень выраженности пороков развития существенно варьируют. Вероятно, внутриутробная гибель эмбрионов с этой аномалией связана с воздействием дополнительных летальных факторов. По-видимому, то же можно сказать об эмбрионах с кариотипом 47,XXY. В целом доля анеуплоидий по половым хромосомам в рассматриваемой выборке составила 14,3% общего числа аномальных кариотипов.

Помимо уже отмеченных хромосом, в формировании анеуплоидий участвовали еще 10 различных аутосом. Во всех случаях наблюдались трисомии, а моносомии не выявлялись. Невысокая частота каждой из этих аномалий позволяет предположить случайный характер мутационных событий, происходящих при формировании соответствующих анеуплоидий. При этом в составе кариотипов избыточными могли быть как крупные хромосомы (2-я, 3-я), так и самые маленькие (21-я и 22-я).

Отсутствие в выборке образцов с анеуплоидиями прочих хромосом, вероятно, объясняется статистическими причинами. Увеличение объёма проанализированного материала позволило бы обнаружить и иные хромосомные аномалии. Так, в одной из ранее цитированных работ при кариотипировании 200 спонтанных абортусов были выявлены трисомии с участием всех хромосом, за исключением 1, 4, 10, 19 [3]. Увеличение выборки до 233 образцов даёт возможность обнаружить дополнительные трисомии по хромосомам 4 и 10 [4]. Отсутствие (или крайне редкая встречаемость) трисомий 1 и 19 у абортусов до сих пор не объяснено.

Весьма характерной генетической чертой эмбрионов при неразвивающейся беременности является высокая распространённость полиплоидий (17,1% всех аномальных кариотипов) со значительным преобладанием триплоидии. Это соответствует результатам более ранних исследований [3, 7, 8], в которых максимальная частота триплоидных кариотипов среди генетически аномальных абортусов достигала 21% [8].

Доля всех типов хромосомных aberrаций общего числа хромосомных аномалий, напротив, невысока и составила 5,7%. Нами выявлены только 2 таких случая. В одном из них кариотип был мозаичным, с дополнительной маркерной хромосомой в части клеток (mos47,XY,+mar[9]/46,XY[11]). В другом образце выявлена несбалансированная транслокация материнского происхождения 46,XY,der(14)t(14;15)(p11;q22),mat.

Для того чтобы объяснить столь значительный вклад хромосомных нарушений в прекращение развития эмбриона, необходимо принять во внимание срок замирания беременности. В рассмотренной нами выборке эта величина, по результатам УЗИ, составила  $6,6 \pm 0,31$  нед при варьировании показателя в пределах 4—13 нед. Анализ распределения образцов по сроку беременности показал, что в 83,7% случаев остановка развития эмбрионов произошла до 8-й недели беременности (рис. 3). Этот период совпадает со временем раннего (активного) органогенеза. Происходит закладка осевого комплекса (хорда, нервная трубка,

ЦИТОЛОГИЯ

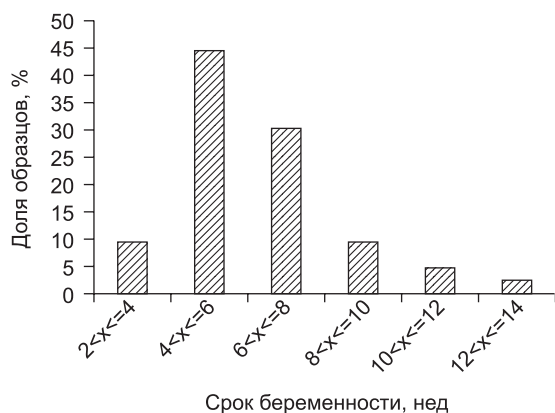


Рис. 3. Распределение образцов в зависимости от срока замирирования беременности, установленного по УЗИ.

сомиты), выделение и формирование зачатков практически всех органов и систем, формирование дефинитивной плаценты. Очевидно, нарушение чёткой работы наследственного аппарата из-за хромосомных аномалий в этот период может послужить достаточной причиной для прекращения дальнейшего развития эмбриона [5].

Вместе с тем полное отсутствие в изученном материале моносомий по аутосомам может свидетельствовать о наличии внутриутробной гибели эмбрионов на ещё более ранних стадиях развития, что с трудом поддаётся учёту и цитогенетическому исследованию. Наоборот, среди эмбрионов, преодолевших эти этапы отбора, остаётся минимальное количество носителей хромосомных аномалий, несовместимых с жизнью. В дальнейшем большая их часть будет самопроизвольно элиминирована, а частота хромосомных нарушений у новорождённых не превысит 1% [8].

С практической позиции цитогенетическое исследование абортного материала важно в двух аспектах. Хромосомные аномалии, выявляемые у эмбрионов, считаются спорадическим событием, их появление непредсказуемо, а причины до конца не ясны. С этой точки зрения выявление аномалии даёт повод надеяться на отсутствие у женщины иных патологий, повлекших замирание беременности. Последующие беременности могут реализоваться вполне успешно. Напротив, отсутствие в эмбриональных клетках хромосомных нарушений побуждает продолжить поиск причин репродуктивной неудачи, что будет сопряжено с дополнительными обследованиями женщины и, возможно, терапевтическими процедурами.

С другой стороны, всё более широкое использование вспомогательных репродуктивных технологий требует внедрения сопутствующих методов оценки генетического здоровья эмбриона. Цитогенетические исследования эмбрионального материала при неразвивающейся беременности после ЭКО и ИКСИ показали, что частота хромосомной патологии и спектр аномалий в этом случае сопоставимы с популяционными показателями [9].

Выявление хромосомных нарушений в абортном материале после ЭКО и ИКСИ может свидетельствовать об использовании генетически дефектных гамет или мутационном событии, произошедшем после оплодотворения. Отсутствие хромосомных нарушений свидетельствует об иных причинах неудачной беременности. В обоих случаях цитогенетический анализ даёт ценную информацию

для врача-репродуктолога и позволяет наметить пути дальнейшего анализа и решения возникших проблем.

**Заключение.** Согласно результатам исследования, биологический материал, полученный от замерших беременностей, в 67,3% случаев содержит хромосомные аномалии. Преобладают численные нарушения (анеуплоидии и полиплоидии). Структурные изменения хромосом встречаются значительно реже. Таким образом, хромосомные нарушения можно считать ведущей причиной гибели эмбрионов вплоть до 6—8-й недели беременности. Цитогенетическое исследование абортного материала — ценный диагностический инструмент, позволяющий установить роль генетических факторов в прекращении развития беременности как в случаях естественного зачатия, так и при использовании ВРТ.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 4, 6, 8 см. REFERENCES)

3. Чиряева О.Г., Петрова Л.И., Садик Н.А., Дудкина В.С., Пендина А.А., Фёдорова И.Д., Кузнецова Т.В., Баранов В.С. Цитогенетический анализ хориона при неразвивающейся беременности. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2007; LVI (1): 35—45.
5. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. *Цитогенетика эмбрионального развития человека.* СПб.: Издательство Н-Л; 2007.
7. Тихомирова С.В., Диунов А.Г., Гурьев Д.Л., Нестулей С.Ю. Анализ аномалий кариотипа хориона при неразвивающейся беременности. *Медицинская генетика.* 2016; 15(5): 45—7.
9. Боярский К.Ю., Гайдук С.Н., Леонченко В.В. Причины прерывания беременности после ЭКО и ИКСИ в первом триместре: анализ клинических и цитогенетических данных. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2008. LVII (4): 73—5.

REFERENCES

1. Pfeifer S., Fritz M., Goldberg J. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2012; 98(5): 1103—11.
2. Elish N., Saboda K., O'Connor J., Nasca R., Stanek E.J., Boyle C. A prospective study of early pregnancy loss. *Human Reproduction.* 1996; 11(2): 406—12.
3. Chiryayeva O.G., Petrova L.I., Sadik N.A., Dudkina V.S., Pendina A.A., Fedorova I.D., Kuznetsova T.V., Baranov V.S. Direct cytogenetic study of chorionic samples from the arrested pregnancy tissues. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2007; LVI (1): 35—45. (in Russian)
4. Philipp T., Philipp K., Reiner A., Beer F., Kalousek D.K. Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. *Human Reproduction.* 2003; 18(8): 1724—32.
5. Baranov V.S., Kuznetsova T.V. *Cytogenetics of human embryo development [Citogenetika embrional'nogo razvitiya cheloveka].* St. Petersburg: Izdatel'stvo N-L; 2007. (in Russian)
6. Shaffer L.J., McGowan-Jordan J., Schmid M. *ISCN 2013. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013).* Basel: Karger; 2013.
7. Tikhomirova S.V., Diunov A.G., Guriev D.L., Nestuley S.Yu. Analysis of abnormalities of chorion karyotype in cases of non-developing pregnancy. *Meditinskaya genetika.* 2016; 15(5): 45—7. (in Russian)
8. Jacobs P., Hassold T. The origin of numerical chromosome abnormalities. *Adv. Genet.* 1995; 33: 101—33.
9. Boyarsky C.Y., Gaidukov S.N., Leonchenko V.V. The causes of arrested IVF and ICSI pregnancies in the first trimester: analysis of clinical and cytogenetic data. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2008; LVII (4): 73—5. (in Russian)

Поступила 13.04.17

Принята к печати 15.04.17