УДК 576.316:575.113.1

ЭФФЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ ПРИ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Маркова Ж.Г., Мусатова Е.В., Тарлычева А.А., Шилова Н.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, e-mail: zhmark71@mail.ru

Проблема невынашивания беременности является актуальной и социально значимой. Более 50 % случаев остановки развития и внутриутробной гибели эмбриона обусловлено хромосомными аномалиями. Использование метода сравнительной геномной гибридизации (CGH) позволило выявить хромосомные аномалии, ассоциированные с невынашиванием беременности и избежать трудностей, связанных с культивированием клеток трофобласта. Исследовано 146 образцов хориона при невынашивании беременности. Верификацию геномного дисбаланса, выявленного при CGH, проводили с помощью FISH анализа с соответствующими локус-специфичными и центромерными ДНК-зондами. Для определения плоидности использовали флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) в интерфазных ядрах с ДНК-зондами на центромерные районы хромосом 18, X и Y. Хромосомные аномалии (ХА) были выявлены в 51,4 % случаев. Среди 75 случаев ХА, в 58,7 % выявлена трисомия по аутосомам, в 22,7 % случаев – триплоидия. Моносомия X диагностирована в 7 наблюдениях (9,3 %). Сочетанные ХА выявлены в 3 наблюдениях (4 %) и представлены трисомией по хромосомам 9 и 16, моносомией X и трисомией по хромосоме 22, а также моносомией X с частичной трисомией 6q. Наиболее частыми ХА явились трисомия по хромосомам 16 (34,1 %), 22 (18,2 %) и 15 (13,6 %). Трисомия по хромосомам 13 и 21 выявлена в 4 случаях (9,1 %) каждая. Кроме того, диагностированы по 2 случая трисомии по хромосоме 4 и 5 (4,5 %), а также единичные случаи трисомии по хромосомам 2, 10 и 18. Таким образом, метафазная CGH с последующей FISH в интерфазных ядрах позволяет эффективно выявлять случаи хромосомной патологии при невынашивании беременности.

Ключевые слова: неразвивающаяся беременность, хромосомные аномалии, сравнительная геномная гибридизация.

EFFICIENT DIAGNOSIS OF CHROMOSOMAL ABNORMALITIES IN FETAL LOSS

Markova Zh.G., Musatova E.V., Tarlycheva A.A., Shilova N.V.

Federal state scientific budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moscow, e-mail: zhmark71@mail.ru

Spontaneous abortion is one of the most frequent problem of pregnancy. More than 50 % of all spontaneous abortions have abnormal karyotype. Comparative genomic hybridization (CGH) can detect chromosomal abnormalities associated with spontaneous abortions while avoiding the technical problems associated with tissue culture. A total of 146 spontaneous abortions (4–20 weeks of gestation) were studied by CGH. The additional aneuploidies detected by CGH were confirmed by targeting FISH with corresponding DNA probes. All samples shown to be chromosomally balanced in CGH underwent interphase FISH to determine a ploidy with DNA probes for chromosomes 18, X and Y. The overall rate of detected numerical chromosomal abnormalities was 51.4 %. Trisomies of autosomes were the predominant chromosomal aberrations (58.7 %) followed by triploidy (22.7 %) and monosomy X (9.3 %). An unbalanced structural rearrangement was found in 4 (5.3 %) cases. In 3 cases complex aneuploidies were identified: double trisomy 9 and 16, monosomy X simultaneously with tiresome 22 and monosomy X with partial trisomy 6q. Most frequently involved in trisomies were chromosomes 16 (34.1 %), 22 (18.2 %) and 15 (13.6 %), Trisomy of chromosomes 13 and 21 was identified in 4 cases (9.1 %) each. Trisomy 4 and 5 was diagnosed twice (4.5 %) each. Trisomies of 2, 10 and 18 chromosomes was found in one (2.3 %) cases each. We concluded that FISH analysis, followed by CGH is a suitable technique for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion.

Keywords: spontaneous abortions, chromosomal abnormalities, comparative genomic hybridization.

Проблема невынашивания беременности является актуальной и социально значимой. Причины невынашивания беременности многочисленны. Они могут быть вызваны генетическими (генные, геномные и хромосомные мутации, иммунологическая

несовместимость) и негенетическими (заболевания матери, химические и физические воздействия) факторами [5]. Известно, что 10–15 % клинически диагностированных беременностей останавливаются в развитии на ранних этапах эмбриогенеза. Около 50 % случаев ранней остановки развития и внутриутробной гибели эмбриона обусловлено хромосомными аномалиями, такими как аутосомные трисомии, полиплоидия, моносомия X хромосомы и несбалансированные структурные перестройки [5,9]. Большинство из этих отклонений являются спорадическими и возникают *de novo*. Генетический анализ тканей плода имеет большое значение для установления основной причины невынашивания беременности, выбора дальнейшей тактики обследования женщины, планирования и наблюдения последующих беременностей [4,8].

В настоящей работе для определения хромосомного статуса эмбриона при репродуктивных потерях использован метод метафазной сравнительной геномной гибридизации (comparative genomic hybridization – CGH), который также называют «молекулярным кариотипированием». Этот метод позволяет провести анализ всего генома в рамках одного исследования.

CGH-анализ основан на одновременной гибридизации опытной и контрольной (полученной от нормального индивидуума) ДНК, меченных двумя разными флюорохромами, на хромосомный препарат из культуры лимфоцитов здорового донора. Путем сравнения относительной интенсивности флюоресценции двух флюорохромов по всей длине каждой хромосомы выявляется геномный дисбаланс в виде дупликации или делеции [1,2]. Ограничением применения CGH для анализа тканей плода при репродуктивных потерях является неинформативность этого метода при кратном увеличении генома (триплоидия, тетроплодия). Чтобы преодолеть это ограничение и повысить эффективность анализа, в дополнение к CGH мы использовали интерфазную флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с ДНК-зондами на центромерные районы хромосом 18, X и Y в интерфазных ядрах для определения плоидности [3,9].Такой подход позволяет выявить практически все числовые и несбалансированные структурные хромосомные перестройки размером более 4 м.п.н., в том числе ассоциированные с репродуктивными потерями, а также избежать трудности, связанных с получением хромосомных препаратов для цитогенетического анализа.

Цель исследования

Оценка эффективности выявления и определение спектра ХА методами молекулярного кариотипирования.

Материалы и методы

Исследовано 146 образцов ткани хориона (плаценты), полученных после прерывания беременности. Показаниями для прерывания являлись: неразвивающаяся беременность (n=131), анэмбриония (n=8) и врожденные пороки у плода, ВПР (n=7) в сроке от 4 до 20 недель беременности. Средний возраст женщин составил 32,3±4.6 года.

Во всех случаях хорион был визуально оценен, тщательно отобран от материнских тканей и отмыт от примесей крови.

От каждого образца 5–10 мг ворсин хориона использовали для получения отпечатков ткани с последующей обработкой [6]. Из остального материала выделяли ДНК методом экстракции фенол-хлороформом для проведения сравнительной геномной гибридизации.

ДНК плода (опытная) и референсная ДНК (контрольная) мечены в реакции ник-трансляции SpectrumGreen dUTP и SpectrumRed dUTP (AbbottMolecular, США) по стандартному протоколу [2]. Платформой для совместной гибридизации опытной и референсной ДНК служили хромосомные препараты из культуры лимфоцитов периферической крови доноров – мужчин с нормальным кариотипом. Реакцию сравнительной геномной гибридизации и постгибридизационную отмывку проводили по протоколу фирмы производителя (AbbottMolecular, США). Для контрокрашивания хромосом использовали DAPI I (AbbottMolecular, США) в растворе Vectashield (VectorLabs, США) в соотношении 1:20.

Анализ изображений метафазных хромосом проводили на эпифлуоресцентном микроскопе «Eclipse*90i*» (Nikon, Япония), оборудованном CCD камерой «ProgResMF» (JENOPTIK) и программой обработки изображения «LuciaCGH» (Чехия). Для каждого образца анализировали 10–15 метафазных пластинок.

FISH анализ интерфазных ядер с ДНК зондами: SE2 (D2Z2), SE4 (D4Z1), SE10 (D10Z1), SE 15 (D15Z4), SE 16 (D16Z2), SE18 (D18Z1), SE 20 (D20Z1), SE (XY18), SE (X,Y), PN13 (13q14), PN 21 (21q22), Sub-Telomere5qter (D5S2006), Sub-Telomere 6qter (D6S2523), Sub-Telomere9pter (D9S917), Sub-Telomere9qter (D9S1838), Sub-Telomere11qter (D11S4437), Sub-Telomere20pter (D20S1156), Sub-Telomere 20qter (RH44234), Sub-Telomere22qter (D22S1056) (Kreatech, Нидерланды) проводили по протоколам фирмы – производителя. Анализ осуществляли на эпифлуоресцентном микроскопе «AxioImagerM.1» (CarlZeiss, Германия) с соответствующим набором светофильтров и с использованием компьютерной программы обработки цифровых изображений «Isis» (MetaSystems, Германия).

Результаты и обсуждение

Из всех образцов хориона получено достаточное для анализа количество ДНК, и проведена сравнительная геномная гибридизация.

При отсутствии хромосомного дисбаланса плоидность определяли при проведении

FISH с ДНК зондами на центромерные районы хромосом 18, X и Y. Все случаи обнаружения дисбаланса при CGH подтверждались с помощью интерфазной FISH с соответствующими локус-специфичными или центромерными зондами.

Из 146 наблюдений, хромосомный и геномный дисбаланс не обнаружен в 71 случае, что составило 48,6 %. Различные ХА выявлены в 75 случаях. Таким образом, частота ХА при невынашивании беременности составила 51,4 %. Спектр выявленной хромосомной патологии включал практически все типы ХА, приводящие к антенатальной гибели плода, кроме моносомии по аутосомам и тетраплоидии (табл. 1).

Среди 75 случаев хромосомной патологии в 58,7 % (44 образца) выявлена трисомия по аутосомам. Триплоидия определена в 22,7 % случаев (n=17), из них: в 9 случаях дигенического (XXX), а в 8 – диандрического (XXY) происхождения. Моносомия X диагностирована в 7 наблюдениях (9,3 % от всех ХА). Сочетанная хромосомная патология выявлена в 3 наблюдениях (4 % от всех ХА) и представлена двойной трисомией по хромосомам 9 и 16, моносомией X в сочетании с трисомией по 22 хромосоме и моносомией X с частичной трисомией 6q.

Геномный дисбаланс в виде делеции и/или дупликации терминальных районов хромосом диагностированы в 4 наблюдениях (5,3 %) при наличии ВПР у плода. В 2 случаях, при частичной трисомии по длинному плечу хромосомы 20 у плода и частичной трисомии по длинному плечу хромосомы 22/частичной моносомии по длинному плечу хромосомы 11 установлено, что причиной аномального фенотипа у плода являлся геномный дисбаланс вследствие патологической мейотической сегрегации хромосом при аутосомной реципрокной транслокации у родителя-носителя – 46,XY,t(16;20)(p13.3;q13.13) и 46,XX,t(11;22)(q23.3;q12.2), соответственно. Важно отметить, что в случае t(16;20)(p13.3;q13.13) при CGH не выявлена делеция района 16q13.3-qter из-за ограничения разрешающей способности метода, поскольку размер транслоцированного сегмента не превышает 4 млн.п.н. Тем не менее информация, полученная при исследовании абортного материала методом CGH, позволила установить сбалансированную транслокацию у отца, когда дериватная хромосома 16 обнаружена при таргетной FISH с ДНК-зондом на субтеломерный район длинного плеча хромосомы 20. В остальных двух случаях установить происхождение хромосомной аномалии у плода оказалось невозможным.

Таблица 1

Результаты использования методов метафазной CGH и FISH анализа для исследования материала неразвивающихся беременностей (n = 146)

Выявленная патология	CGH	FISH	Кол-во случаев(%)
Триплоидия	ishcgh(1-22)×2	nucish(D18Z1×3)	17 (22,7)
Моносомия X	ishcgh(1-22)×2,(X)×1	nucish(DXZ1×1,DYZ3×0)	7 (9,3)
Трисомии аутосом:			44 (58,7)
+ 16	ishcghenh(16)	nucish(D16Z2)×3	15
+22	ishcghenh(22)	nucish(D22S1056)×3	8
+15	ishcghenh(15)	nucish(D15Z4)×3	6
+21	ishcghenh(21)	nucish(21q22)×3	4
+13	ishcghenh(13)	nucish(13q14)×3	4
+4	ishcghenh(4)	nucish(D4Z1)×3	2
+5	ishcghenh(5)	nucish(D5S2006)×3	2
+2	ishcghenh(2)	nucish(D2Z2)×3	1
+10	ishcghenh(10)	nucish(D10Z1)×3	1
+18	ishcghenh(18)	nucish(D18Z1)×3	1
Сочетанные хромосомные аномалии:			3 (4)
Двойная трисомия по хромосомам 9 и 16	ishcghenh(9), enh(16),(X)×2	nucish(D16Z2×3) nucish(D9S917×3)	1
Моносомия X и трисомия по хромосоме22	ishcghenh(22),(X)×1	nucish(D22S1056×3), (DXZ1×1,DYZ3×0)	1
Моносомия X и частичная трисомия по хромосоме 6	ishcghenh(6)(q21qter),(X)×1	nucish(D6S2523x3), (DXZ1×1,DYZ3×0)	1
Структурные перестройки хромосом:			4 (5,3)
Частичная трисомия по хромосоме 20	ishcghenh(20) (q13.13qter),(XY)×1	nucish (D20S1156×2,RH44234×3)	2
Частичная трисомия по хромосоме 9	ishcghenh(9)(p11.2p24.3), (XY)×1	nucish (D9S917×3, D9S1838)	1
Частичная трисомия по хромосоме 22, частичная моносомия по хромосоме 11	ishcghenh(22) (q13.1qter), dim(11) (q23.3qter),(XY×1)	nucish (D11S4437x1, D22S1056×3)	1

Трисомия по различным аутосомам являлась наиболее частой хромосомной патологией. Частота встречаемости различных трисомий колебалась в широких пределах (Рисунок 1).

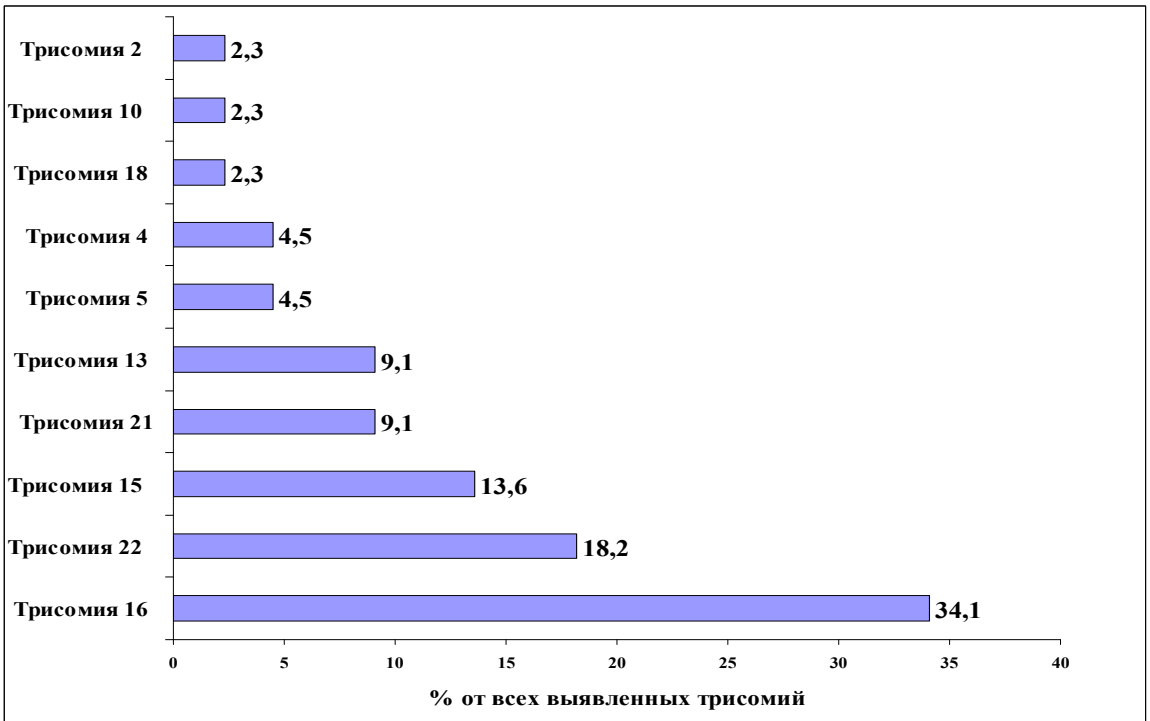

Рисунок 1. Частота встречаемости различных трисомий

Среди 44 выявленных случаев трисомии наиболее часто встречались трисомия по хромосомам 16 (15 случаев – 34,1 %) и 22 (8 случаев – 18,2 %). Частота трисомии по хромосоме 15 составила 13,6 % (6 случаев). Трисомия по хромосомам 13 и 21 выявлена в 4 случаях (9,1 %) каждая. Кроме того, диагностированы по 2 случая трисомии хромосом 4 и 5 (4,5 % каждая), а также единичные случаи трисомии по хромосомам 2, 10 и 18.

Долгое время стандартное цитогенетическое кариотипирование являлось традиционным методом установления хромосомного статуса плода при репродуктивных потерях. Однако данный метод имеет ряд ограничений, обусловленных особенностями ткани, используемой для анализа. Так, вследствие сниженной пролиферативной и митотической активности клеток хориона при неразвивающейся беременности, не всегда возможно получить хромосомные препараты. По данным ряда авторов, до 20 % образцов ткани хориона оказываются недоступны для цитогенетического анализа [1,8,5,10]. Часто трудно добиться хорошей морфологии хромосом, для точной идентификации хромосомной патологии. Кроме того, возможно получение ложного результата из-за контаминации образца материнскими клетками [1,8,9]. Методы молекулярной цитогенетики дают возможность исследовать хромосомный набор клеток с исключением этапа их культивирования [1].

По данным многочисленных наблюдений, примерно 50 % репродуктивных потерь обусловлено аномалиями хромосомного набора эмбриона [1,5,8]. Использование метода метафазной CGH с последующим FISH анализом показало аналогичную частоту

хромосомных нарушений в исследуемой выборке. При этом анализ проведен в 100 % случаев.

Показано, что трисомии по аутосомам составляют 59–68 % от всей выявляемой патологии хромосом у плода, полиплоидия – 15–19 %, моносомия X – 8–14 %. Несбалансированные структурные перестройки хромосом выявлены в 4–8 % случаев ХА. Прочая хромосомная патология (двойные и тройные трисомии, мозаицизм, монсомии по аутосомам) составляет от 2 до 12 % от всех случаев ХА [5,9]. Полученные нами данные по спектру хромосомной патологии при невынашивании беременности совпадают с результатами других авторов и доказывают высокую эффективность комбинированного использования двух молекулярно-цитогенетических методов (CGH и FISH) для анализа причин невынашивания беременности.

Выявление при CGH геномного дисбаланса в виде делеции и/или дупликации отдельных районов хромосом свидетельствует о наличии структурной хромосомной аномалии у плода и является показанием для исследования кариотипов родителей с целью установления ее происхождения, что, в свою очередь, позволяет повысить эффективность медико-генетического консультирования семьи и определить тактику планирования, ведения последующих беременностей и меры профилактики хромосомной патологии.

Заключение

Метод сравнительной геномной гибридизации (CGH) в сочетании с FISH-анализом показал высокую эффективность для установления хромосомного статуса эмбриона, плода при репродуктивных потерях и может служить альтернативой цитогенетическому анализу для установления причин невынашивания беременности.

Список литературы

1. Лебедев И.Н. Молекулярно-цитогенетическая характеристика хромосомных аномалий при анэмбрионии и неразвивающейся беременности: автореф. дис. … канд. биол. наук. – Томск, 2001. – 25 с.
2. Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / под ред. чл.-корр. РАЕН А.Б. Масленникова. – Вып. 21. – Новосибирск: Академиздат, 2014. – 206 с.
3. Миньженкова М.Е., Шилова Н.В., Маркова Ж.Г., Козлова Ю.О. Золотухина Т.В. Эффективность различных методов диагностики хромосомных аномалий при репродуктивных потерях // Медицинская генетика. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 25-30.
4. Fritz B, Hallermann C, Olert J, et al. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH) – reevaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous

abortions//. Eur J HumGenet. – 2001. – 9. – P.539- 547.

5. Hardy K., Hardy Ph. 1st trimester miscarriage: four decades of study // TranslPediatr. – 2015. – Apr; 4(2). – P.189–200.

6. Klinger K1, Landes G, Shook D, Harvey R, Lopez L, Locke P, Lerner T, Osathanondh R, Leverone B, Houseal T, et al. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH) // Am J Hum Genet. – 1992. – Jul; 51(1). – P.55-65.

7. Lathi RB, Gustin SL, Keller J, et al. Reliability of 46, XX results on miscarriage specimens: a review of 1222 first trimester miscarriage specimens // FertilSteril. – 2014. – 101-P.178-182.

8. Lomax B, Tang S, Separovic E, Phillips D, Hillard E, Thomson T, Kalousek DK Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions // Am J Hum Genet. – 2000. – 66. – P.1516–1521.

9. Van den Berg MM, van Maarle MC, van Wely M, et al. Genetics of early miscarriage // Biochim Biophys Acta. – 2012. – 1822(12). – P.1951-1959.