

УДК 618.39

ДИАГНОСТИКА ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ ПЛОДА ПРИ ПОТЕРЯХ БЕРЕМЕННОСТИ

Панченко Е.Г.^{1,5}, Канивец И.В.^{1,2}, Романова И.И.^{1,3}, Булева О.Н.¹, Киевская Ю.К.¹, Кудрявцева Е.В.^{1,4}, Пьянков Д.В.¹, Коростелев С.А.¹

1 — Медико-генетический центр «Геномед» 115093, г. Москва, Подольское ш., 8 корпус 5, тел. 8 (800) 333-45-38

2 — ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» МЗ РФ 123242, г. Москва, Баррикадная ул., 2/1, стр. 1, тел. 8 (499) 252-21-04

3 — ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» 420008, Республика Татарстан, г. Казань, Кремлевская улица, 18, тел. 8 (843) 233-71-09

4 — ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» 620014, Екатеринбург, ул. Репина, 3, тел. 8 (343) 214-86-52

5 — ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» МЗ РФ 117997, г. Москва, ул. Островитянова д. 1, тел. 8 (495) 434-03-29

Цель исследования – оценить частоту и структуру хромосомных аномалий при исследовании абортивного материала с помощью SNP - хромосомного микроматричного анализа (ХМА). 2109 образцов ДНК, выделенной из ворсин хориона и тканей плодов, предоставленных на анализ при потере беременности, исследовано методом SNP-ХМА с использованием SNP-олигонуклеотидных микроматриц CytoScan Optima (ThermoFisher Scientific, США). В результате исследования в 51,73% (1091) случаев в абортивном материале обнаружены клинически значимые аномалии, в 48,27% (1018) образцов - несбалансированные хромосомные аномалии размером более 800 т.п.н. выявлены не были. Анеуплоидии выявлены в 79,65% случаев, триплоидия - в 10,72%, тетраплоидия - в 1,01% случаев. Доля других выявленных ХА составила 8,62%. ХМА эффективен для поиска ХА, как причин потери беременности.

Ключевые слова: хромосомный микроматричный анализ, абортивный материал, потеря беременности.

DIAGNOSIS OF FETAL CHROMOSOMAL ABNORMALITIES IN PREGNANCY LOSS

Panchenko E. G.^{1,5}, Kanivets I. V.^{1,2}, Romanova I. I.^{1,3}, Buleva O. N.¹, Kievskaya Yu. K.¹, Kudryavtseva E. V. ^{1,4}, Pyankov D. V.¹, Korostelev S. A.¹

1 — Genetic Center «Genomed» LTD Podolsk sh., 8, Building 5, 115093, Moscow, Russia, tel. 8 (800) 333-45-38

2 — Russian medical Academy of continuing professional education of the Ministry of health of the Russian Federation Barrikadnaya Str., 2/1, p.1, 123242, Moscow, Russia, tel. 8 (499) 252-21-04

- 3 — Kazan (Volga region) Federal University
Kremlin Str., 18, 420008, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia, tel. 8 (843) 233-71-09
- 4 — Ural State Medical University
Repin St., 3, 620014, Yekaterinburg, Russia, tel. 8 (343) 214-86-52
- 5 — Pirogov Russian National Research Medical University
Ostrovityanova St., 1, 117997, Moscow, Russia, tel. 8 (495) 434-03-29

Study objective is to evaluate the frequency of occurrence and structure of chromosomal abnormalities in the study of abortive material using SNP-chromosomal microarray analysis (SNP-CMA). 2109 samples of DNA, isolated from chorionic villi and fetal tissues, provided for analysis during pregnancy loss, were studied by SNP-CMA, using SNP-oligonucleotide microarray CytoScan Optima (ThermoFisher Scientific, USA). As a result of the study, clinically significant abnormalities were found in 51.73% of cases in the abortive material, and unbalanced chromosomal abnormalities larger than 800 kb were not detected in 48.27% of samples. Aneuploidy was detected in 79.65% of cases, triploidy-in 10.72%, tetraploidy-in 1.01% of cases. The share of other detected chromosomal abnormalities was 8.62%. SNP-CMA is an effective method for diagnostics of chromosomal abnormalities as a cause of pregnancy loss.

Key words: chromosomal microarray analysis, abortive material (POC), pregnancy loss.

Проблема невынашивания беременности (НБ) актуальна, так как частота невынашивания беременности составляет около 18-20% среди всех клинически зарегистрированных беременностей. Хромосомные аномалии (ХА) являются причиной потери беременности в 50-60% случаев, достигая в первом триместре 80% [5]

Для анализа ХА в абортивном материале используются различные методы: стандартный цитогенетический анализ (анализ кариотипа), FISH-исследования, КФ-ПЦР, array-CGH, SNP-microarray analysis (ХМА), NGS.

Стандартный цитогенетический анализ позволяет диагностировать ХА размером более 10 миллионов пар нуклеотидов (Mb) [3;6], что не позволяет детектировать субмикроскопические структурные ХА. Кроме того, методика кариотипирования предполагает культивирование клеток абортивного материала, что, примерно в 10-40% случаев обуславливает неудачу исследования [8], связанную, в том числе, с контаминацией материнскими клетками [14], а также гибелью и полиплоидизацией клеточной культуры [1; 2].

Такие методы исследования как FISH-исследование и КФ-ПЦР предполагают анализ наиболее частой хромосомной патологии, встречаемой при НБ [7], что не позволяет оценить весь спектр ХА в абортивном материале и может быть причиной некорректного прогноза по вопросам планирования последующей беременности.

Методика array-CGH позволяет детектировать несбалансированные ХА размером менее 10 Mb, однако, недостатком метода является невозможность выявления триплоидии, тетраплоидии, мозаицизма и контаминации материнскими клетками. [12]

NGS-исследование позволяет провести оценку вариаций числа копий генов с высокой точностью, но данный метод, не может быть применен для выявления триплоидии (69,XXX) и тетраплоидии и, следовательно, может быть использован с уверенностью только для поиска анеуплоидий в абортном материале [11] Также для метода NGS характерны высокая стоимость, длительный срок исполнения, необходимость анализа большого объема данных.

ХМА позволяет исследовать несбалансированные ХА размером менее 10 Мб, а также, благодаря наличию SNP-маркеров, с помощью этого метода, возможна детекция триплоидии, тетраплоидии, мозаицизма и контаминации материнскими клетками [9;10]

Таким образом, ХМА имеет диагностические преимущества в случаях необходимости детекции ХА в абортном материале.

Цель: оценить частоту и структуру хромосомных аномалий при исследовании абортного материала с помощью ХМА.

Материалы и методы: 2109 образцов ДНК исследовано методом ХМА с использованием SNP-олигонуклеотидных микроматриц CytoScan Optima (ThermoFisher Scientific, США). ДНК была выделена из ворсин хориона и тканей плодов, предоставленных за период 2015-2019 гг. на анализ при потерях беременности в разных сроках. Возрастная группа беременных женщин, потерявших беременность - от 16 до 49 лет.

Отбор ворсин хориона/тканей плода для проведения SNP-ХМА абортного материала предполагает морфологическую оценку абортного материала с целью отбора плодного материала. Метод ХМА позволяет обнаружить контаминацию материнскими клетками в ходе проведения исследования, однако, в случае необходимости дополнительной проверки - осуществляется сопоставление профилей абортной и материнской ДНК.

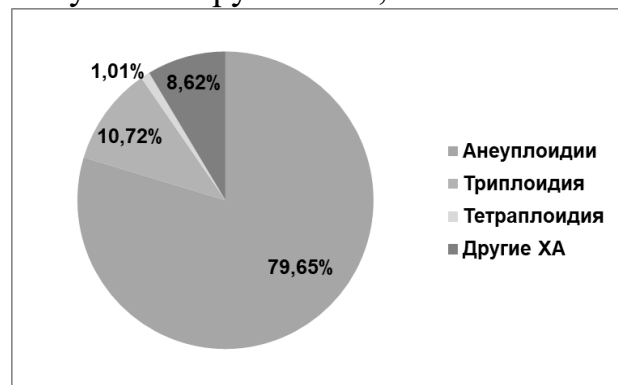
Технология проведения ХМА предполагает выделение, амплификацию, энзиматическую рестрикцию ДНК, мечение полученных фрагментов ДНК специфическими метками, гибридизацию ДНК на микроматрицах, в ходе которой каждый фрагмент связывается с комплементарными олигонуклеотидами на микроматрице, промывку и окрашивание микроматрицы буферами, сканирование микроматрицы и получение данных для последующего анализа. В исследовании абортного материала использовалась микроматрица, содержащая 166468 маркеров, включая SNP-маркеры (система Геноскан 3000 (РУ №ФСР 2010/08511 от 11.08.2010).

Для статистической обработки результатов исследования использовалась программа Microsoft Office Excel (2010).

Результаты: в результате исследования в 51,73% (1091) случаев в абортном материале обнаружены клинически значимые ХА, в 48,27% (1018) образцов - несбалансированные хромосомные аномалии размером более 800 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) не выявлены.

В ходе исследования была выявлена различная хромосомная патология. Группы ХА представлены на рисунке 1, подробная структура ХА – в таблице 1.

Рисунок 1. Группы ХА, выявленных в абортном материале



Анеуплоидии выявлены в 79,65% случаев, триплоидия - в 10,72%, тетраплоидия - в 1,01% случаев от общей выявленной патологии. Доля других выявленных ХА составила 8,62% от общей выявленной патологии, из них делеции/дупликации, указывающие на высокую вероятность несбалансированных транслокаций выявлены в 17,02% (16 случаев - 1,47% от общей выявленной патологии) и делеционные/дупликационные синдромы, описанные в базе данных OMIM [<https://www.omim.org>] также выявлены в 19,15% (18 случаев - 1,65% от общей выявленной патологии) (таблица 2).

Таблица 1. Структура выявленной хромосомной патологии

Хромосомная аномалия	Число случаев, абс. (%)	
Анеуплоидии	Регулярные анеуплоидии	Мозаицизм
Анеуплоидии одной хромосомы	599 (54,9)	194 (17,78)
Трисомия 2	9 (0,82)	10 (0,92)
Трисомия 3	7 (0,64)	2 (0,18)
Трисомия 4	11(1,01)	3 (0,27)
Трисомия 5	4 (0,37)	-
Трисомия 6	6 (0,55)	7 (0,64)
Трисомия 7	16 (1,47)	3 (0,27)
Трисомия 8	11 (1,01)	2 (0,18)
Трисомия 9	18 (1,65)	6 (0,55)
Трисомия 10	5 (0,46)	1 (0,09)
Трисомия 11	4 (0,37)	1 (0,09)
Трисомия 12	6 (0,55)	2 (0,18)

Хромосомная аномалия	Число случаев, абс. (%)	
Трисомия 13	43 (3,94)	10 (0,92)
Трисомия 14	14 (1,28)	5 (0,46)
Трисомия 15	64 (5,87)	7 (0,64)
Трисомия 16	89 (8,16)	67 (6,14)
Трисомия 17	2 (0,18)	4 (0,37)
Трисомия 18	26 (2,38)	2 (0,18)
Моносомия 18	-	1 (0,09)
Трисомия 19	-	1 (0,09)
Моносомия 19	-	10 (0,92)
Трисомия 20	13 (1,19)	3 (0,27)
Трисомия 21	59 (5,41)	6 (0,55)
Моносомия 21	10 (0,92)	1 (0,09)
Трисомия 22	73 (6,69)	23 (2,11)
Моносомия X	106 (9,72)	8 (0,73)
Трисомия X	1 (0,09)	3 (0,27)
Дисомия X	2 (0,18)	5 (0,46)
X/XУ мозаицизм	-	1 (0,09)
Анеуплоидии нескольких хромосом и их мозаичные формы	76 (6,96)	-
Триплоидия	117 (10,72)	-
Тетраплоидия	11 (1,01)	-
Другие аномалии	94 (8,62)	-

Таблица 2. Выявленные делеционные и дупликационные синдромы, описанные в базе данных OMIM

Выявленные делеционные и дупликационные синдромы, описанные в базе данных OMIM	Число случаев, абс. (%)
Синдром рекомбинантной хромосомы 8	1 (0,09)
Синдром делеции 10q26	1 (0,09)

Выявленные делеционные и дупликационные синдромы, описанные в базе данных OMIM	Число случаев, абс. (%)
Синдром делеции 15q11.2	6 (0,55)
Синдром микроделеции 20q13.33	1 (0,09)
Синдром делеции 22q11.2	1 (0,09)
Синдром дистальной делеции 22q11.2	1 (0,09)
Синдром дупликации 22q11.2	1 (0,09)
Синдром делеции 8p23.1	3 (0,27)
Синдром дупликации Xq28 + MECP2 дупликация	1 (0,09)
Синдром делеции 5p	1 (0,09)
Синдром делеции 16p11.2	1 (0,09)

ХА размером менее 10 Mb (которые не были бы выявлены с помощью стандартного цитогенетического исследования) были выявлены в 6,05% (66 случаев - от общей выявленной патологии).

Обсуждение:

Более чем в половине исследованных образцов ДНК, выделенной из абортивного материала, была выявлена различная хромосомная патология, что соотносится с опубликованными ранее данными [5]. При этом среди всех образцов с ХА, было выявлено 6,05% ХА, размер которых меньше, чем разрешающая способность других применяемых в исследовании абортивного материала методов. Это важно учитывать, так как при использовании методов с более низкой разрешающей способностью, причина потери беременности может остаться не установленной.

В ходе исследования абортивного материала были выявлены такие ХА, как анеуплоидии, триплоидия, тетраплоидия и другие аномалии, включающие делеции/дупликации, указывающие на высокую вероятность несбалансированных транслокаций и делеционных/дупликационных синдромов, описанные в базе данных OMIM.

Числовые аномалии хромосом и, в частности, анеуплоидии - самая часто встречающаяся патология, выявляемая в абортивном материале, как в нашем, так и в других исследованиях.[15]. В нашем исследовании, в абортивном материале наиболее часто были выявлены такие анеуплоидии, как моносомия X, трисомия 16 хромосомы и ее мозаичная форма, трисомия 22 и ее мозаичная форма, трисомия 13, 15, 18, 21 хромосом. Наиболее часто встречаемая анеуплоидия - моносомия X (синдром Тернера), что соответствует ранее описанным в литературе данным, где

синдром Тернера является одним из самых частых выявляемых в абортном материале синдромом [13], так как он совместим с живорождением лишь в 2 % случаев [3].

В абортном материале также были выявлены делеции/дупликации, указывающие на высокую вероятность несбалансированных транслокаций. Несбалансированные ХА у эмбриона являются не только следствием нарушения расхождения хромосом в мейозе, но и наличия сбалансированных ХА (транслокаций, инверсий) у одного из родителей (частота носительства в популяции - 1:500 [4]). Зачастую основанием заподозрить подобную ХА у одного из родителей является проведение ХМА абортного материала, исходя из результатов которого, появляется возможность получить информацию том, какие хромосомы задействованы в формировании несбалансированной ХА (которая может быть субмикроскопического размера и не определяться с помощью стандартного цитогенетического исследования). Данная информация помогает выбрать правильную тактику обследования для такой пары и грамотно подойти к вопросам планирования последующей беременности.

Выводы:

В ходе нашего исследования более чем в половине случаев, в предоставленном абортном материале была выявлена различная хромосомная патология. Хромосомный микроматричный анализ в нашем исследовании показал себя эффективным методом, так как позволил с высокой точностью детектировать широкий спектр несбалансированных ХА. Выявление ХА в абортном материале позволяет определить причину потери беременности, избежать назначения нецелесообразных лабораторных и инструментальных исследований, правильно подойти к вопросу планирования беременности, определить прогноз для последующих беременностей, а в случае выявления триплоидии в абортном материале, предупредить развитие такого осложнения, как злокачественная трофобластическая опухоль.

Список литературы:

1. Кашеварова А.А., Суханова Н.Н., Толмачева Е.Н. и др. Ретроспективная молекулярно-цитогенетическая характеристика тетраплоидии при ранней эмбриональной летальности у человека. Цитология. 2007; 49(4): 322-32
2. Кудрявцева Е.В., Ковалев В.В., Потапов Н.Н., Канивец И.В., Антоненко А.В., Коновалов Ф.А., Пьянков Д.В., Коростелев С.А. Сравнительный анализ цитогенетического исследования и хромосомного микроматричного анализа биологического материала при невынашивании беременности. Медицинская генетика, 2018; 17 (5): 23-27
3. Кудрявцева Е.В., Ковалев В.В., Канивец И.В., Коростелев С.А. Современные возможности выявления хромосомных аномалий в абортном материале. Уральский медицинский журнал, 2016; 11(144): 5-8
4. Usha R. Dutta, Rajitha Ponnala, and Ashwin Dalal. A Novel de novo Balanced Reciprocal Translocation t(18;22) Associated with Recurrent Miscarriages: A Case Report., J Reprod Infertil, 2014; 15(2): 113–116

5. Early pregnancy loss. ACOG Practice Bulletin No. 200. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol*, 2018; 132
6. Lingshan Gou , Tianya Liu , Yi Wang , Qin Wu , Shunan Hu , Bulian Dong , Chuanxia Wang , Yan Zhang , Xinghu Shan , Xiaona Wang , Feng Suo & Maosheng Gu. Clinical utilization of chromosomal microarray analysis for the genetic analysis in subgroups of pregnancy loss. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2020;1-8
7. Hardy K, Hardy PJ. 1st trimester miscarriage: four decades of study. *Transl Pediatr*, 2015;4(2):189- 200
8. Ruth B. Lathi, Megan Loring, Jamie A. M. Massie, Zachary P. Demko, David Johnson, Styrmir Sigurjonsson, George Gemelos, Matthew Rabinowitz. Informatics Enhanced SNP Microarray Analysis of 30 Miscarriage Samples Compared to Routine Cytogenetics. *PLoS ONE*, 2012;7(3)
9. Brynn Levy, Styrmir Sigurjonsson, Barbara Pettersen, Melissa K Maisenbacher, Megan P Hall, Zachary Demko, Ruth B Lathi, Rosina Tao, Vimla Aggarwal, Matthew Rabinowitz. Genomic imbalance in products of conception: single-nucleotide polymorphism chromosomal microarray analysis. *Obstet Gynecol*, 2014 Aug;124(2 Pt 1):202-209.
10. Lin, Shao-Bina; Xie, Ying-Juna; Chen, Zhengb; Zhou, Yia; Wu, Jian-Zhua; Zhang, Zhi-Qianga; Shi, Shan-Shanc; Chen, Bao-Jianga; Fang, Quna. Improved assay performance of single nucleotide polymorphism array over conventional karyotyping in analyzing products of conception. *Journal of the Chinese Medical Association*, 2015; 78(7):408-413
11. Diana Massalska, Janusz Grzegorz Zimowski, Julia Bijok, Magdalena Pawelec, Małgorzata Czubak-Barlik, Grzegorz Jakiel and Tomasz Roszkowski. First trimester pregnancy loss: Clinical implications of genetic testing. *J. Obstet. Gynaecol*, 2017;43:23-29
12. Dana B. McQueen M.D., M.A.S. , Ruth Lathi MD , Miscarriage Chromosome Testing: Indications, Benefits and Methodologies. *Seminars in Perinatology*, 2018; 43(2):101-104
13. Masaji Nagaishi, Tatsuo Yamamoto, Kazuso Iinuma, Katsunori Shimomura, Sue Ann Berend and Judith Knops. Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan. *J. Obstet. Gynaecol.*, 2004; 30(3): 237–241
14. Ozawa, N., Sago, H., Matsuoka, K. et al. Cytogenetic analysis of spontaneously discharged products of conception by array-based comparative genomic hybridization. *SpringerPlus*, 2016; 5(1):874
15. Larysa Y. Pylyp & Lyudmyla O. Spynenko & Nataliya V. Verhoglyad & Anna O. Mishenko & Dmytro O. Mykytenko & Valery D. Zukin. Chromosomal abnormalities in products of conception of first-trimester miscarriages detected by conventional cytogenetic analysis: a review of 1000 cases. *J Assist Reprod Genet*, 2018;35(2):265-271