

Прогностическое значение кариотипа эмбриона и предыдущих исходов беременности при привычном невынашивании

Никитина Т.В.* , Саженова Е.А., Толмачева Е.Н., Суханова Н.Н.,
Жигалина Д.И., Минайчева Л.И., Лебедев И.Н.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН,
г. Томск; * e-mail: t.nikitina@medgenetics.ru

Привычное невынашивание беременности (ПНБ) — многофакторная патология, при которой заметная доля случаев имеет неустановленную этиологию. Сравнительный анализ частот аномальных кариотипов у погибших эмбрионов при первичном и вторичном ПНБ может пролить свет на генетическую гетерогенность данных групп. Целью работы явилось установление вклада хромосомных аномалий эмбриона в этиопатогенез первичного и вторичного ПНБ. Прокаротипировано 563 погибших эмбриона, из них 335 от женщин с первичным, и 228 — со вторичным ПНБ. Частота хромосомных aberrаций составила 43,9% и 52,6% в группах с первичным и вторичным ПНБ соответственно ($p = 0,041$). Двойные трисомии обнаружены у 5,2% абортусов, причем абсолютное их большинство выявлено в группе абортусов от матерей со вторичным ПНБ ($p = 0,0002$). Не обнаружено статистически значимых различий по частоте вовлеченности индивидуальных хромосом в анеуплоидии между группами с первичным и вторичным ПНБ. Частота хромосомных аномалий у абортусов выше при вторичном ПНБ, и эта разница обусловлена «нехваткой» эмбрионов с аномальными кариотипами у женщин старшего возраста с первичным ПНБ.

Ключевые слова: первичное и вторичное привычное невынашивание беременности, хромосомные аномалии, спонтанные абортусы.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Prognostic value of embryonic karyotypes and previous pregnancy outcomes in recurrent pregnancy loss

Nikitina T.V.* , Sazhenova E.A., Tolmacheva E.N., Sukhanova N.N.,
Zhigalina D.I., Minaycheva L.I., Lebedev I.N.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk

Recurrent pregnancy loss (RPL) is a multifactorial pathology with significant proportion of idiopathic cases. Comparative analysis of the chromosomal abnormalities rates in abortions in primary vs. secondary RPL can shed light on the genetic heterogeneity of these groups. The aim of this study was to establish the contribution of the embryonic chromosomal abnormalities in the pathogenesis of primary and secondary RPL. Of the 563 abortuses karyotyped, 335 were from women with primary and 228 with secondary RPL. The frequency of chromosomal aberrations was 43.9% and 52.6% in the groups with primary and secondary RPL, respectively ($p = 0.041$). Double trisomy were revealed in 5.2% of abortuses and the most of cases were found in secondary RPL group ($p = 0.0002$). There were no significant differences in the frequency of involvement of individual chromosomes in aneuploidy between groups with primary and secondary RPL. The frequency of aneuploid pregnancy significantly higher in secondary RPL, and this difference is due to the «lack» of abortuses with abnormal karyotypes in older women with primary RPL.

Key words: primary and secondary recurrent pregnancy loss, chromosomal abnormalities, spontaneous abortions.

Введение

Проблема привычного невынашивания беременности (ПНБ), представляющего собой потерю двух и более беременностей подряд, возникает у 2—5% супружеских пар и имеет многофакторную этиологию. Причинами ПНБ могут быть аномалии строения матки, наследственная тромбофилия, иммунные и эндокринные нарушения у матери, аномалии кариотипа у родителей, а также хромосомные нарушения у плода, при этом до

50% случаев ПНБ имеют неустановленную этиологию. Роль генетических факторов в формировании ПНБ подчеркивается фактом, что частота ПНБ среди родственников первой степени пациенток с идиопатическим ПНБ оказывается в несколько раз выше, чем в общей популяции [1].

ПНБ разделяют на первичное, при котором все беременности у женщины заканчивались невынашиванием, и вторичное, когда хотя бы одна из беременностей за-

кончилась рождением ребенка (либо продлилась до срока более 22 недель). Данные литературы о различиях в этиологии, осложнениях и прогнозах при первичном и вторичном ПНБ довольно противоречивы [2, 3].

Акушерский анамнез представляется важным предиктивным фактором для исходов будущих беременностей. Показано, что женщины с живорождением отличаются по эпидемиологическим характеристикам от женщин с только неудачными беременностями в анамнезе: риск последующего невынашивания после серии потерь 2, 3 и 4 беременностей значимо повышен для женщин с первичным ПНБ, по сравнению со вторичным [4]. Результаты различных исследований ПНБ противоречивы: от отсутствия какого-либо положительного влияния предыдущего живорождения на исход последующих беременностей [3, 5, 6] до «стирания» негативного эффекта предыдущих эмбриональных потерь [7].

Сравнение частот кариотипов погибших эмбрионов при первичном и вторичном ПНБ может пролить свет на генетическую гетерогенность данных групп, однако такие исследования немногочисленны, выполнены на незначительных по объему выборках, их результаты противоречивы. В настоящей работе на максимальной, в сравнении с опубликованными литературными данными, по объему выборке спонтанных абортусов определены частоты и спектр хромосомных аномалий у эмбрионов от женщин с первичным и вторичным ПНБ.

Материал и методы

Ретроспективно обследовано 563 абортуса от женщин с ПНБ, прокаротипированных в лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики за период с 1987 по 2018 гг. Abortивный материал поступал из клиник гг. Томска и Северска, предоставлялась информация о возрасте, акушерско-гинекологическом анамнезе женщины, числе и исходе предыдущих беременностей. Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики ТНИМЦ.

К ПНБ относили две и более потери беременности подряд. В зависимости от предшествующего анамнеза пациентки с ПНБ были разделены на две группы:

1) 335 женщин с первичным ПНБ (только потери эмбрионов и плодов в сроке до 22 недель при отсутствии живорожденных или мертворожденных детей);

2) 228 женщин со вторичным ПНБ (хотя бы одна беременность продолжалась более чем 22 недели и закончилась живо- или мертворождением, после чего имело место 2 или более выкидыша в сроке до 22 недель).

Кариотип эмбрионов был установлен путем GTG-анализа после культивирования экстраэмбриональных или эмбриональных фибробластов (479 образца), либо на прямых препаратах ворсин хориона (17 образцов). При невозможности провести кариотипирование применялись интерфазная FISH (8 образцов), CGH (59 образцов). Методы культивирования фибробластов, получения хромосомных препаратов, FISH и CGH описаны в [8].

Вычисление статистической значимости различий между частотами проводили с использованием критерия χ^2 ; сравнения групп — с применением непараметрического критерия Манна—Уитни. Исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики ТНИМЦ с использованием ресурсов биобанка «Биобанк населения Северной Евразии».

Результаты

Сравнение демографических характеристик групп женщин приведено в табл. 1. Возраст женщин и число беременностей в группе со вторичным ПНБ были статистически значимо выше, чем у женщин с первичным ПНБ.

Распределение возрастов женщин оказалось смещено на 5 лет в большую сторону для вторичного ПНБ (рис. 1). Так как эта группа состоит из пациенток с повторными выкидышами, произошедшими после живо- или мертворождения, повышенный возраст женщин обусловлен большим числом беременностей в их анамнезе.

Таблица 1

Характеристика исследованных выборок

	ПНБ, n = 563	Первичное ПНБ, n = 335	Вторичное ПНБ, n = 228	p
Возраст женщин, лет	29,2 ± 6,0 (17-56; 29)	27,1 ± 5,5 (17-56; 26)	32,2 ± 5,5 (19-44; 32)	0,0002
Возраст мужчин, лет	31,8 ± 6,9 (19-60; 31)	30,1 ± 6,7 (19-60; 29)	34,3 ± 6,4 (21-54; 34)	0,08
Срок беременности, недель	9,6 ± 2,8 (3,1-22; 9,3)	9,5 ± 2,6 (3,1-18; 9,1)	9,8 ± 3,0 (3,4-22; 9,3)	0,85
Число беременностей	4,0 ± 2,3 (2-21; 3)	3,0 ± 1,4 (2-12; 3)	5,3 ± 2,6 (3-21; 5)	0,007
Число выкидышей	2,7 ± 1,2 (2-12; 2)	2,6 ± 1,2 (2-12; 2)	2,7 ± 1,1 (2-9; 2)	0,56
Примечание. Среднее ± ст. отклонение (минимальное и максимальное значения; медиана); p вычисляли при сравнении первичного и вторичного ПНБ				

Аномалии кариотипа были обнаружены у 46,9% (264/563) привычных выкидышей. В группе с первичным ПНБ aberrантные кариотипы имели 43,9% абортусов, а в группе со вторичным ПНБ — 52,6% абортусов ($p = 0,041$), то есть вклад хромосомных аномалий в эмбриональную гибель был выше при вторичном ПНБ. После стратификации групп женщин по возрасту оказалось, что частота эмбрионов с аномальными кариотипами статистически значимо возрастает у женщин старшей возрастной группы при вторичном, но не при первичном ПНБ (рис. 2).

Самой частой хромосомной патологией были трисомии аутосом (46,4% от аномальных кариотипов, включая 5,2% двойных трисомий). Вовлеченность индивидуальных хромосом в трисомии показана на рис. 3, статистически значимых различий между группами с первичным и вторичным ПНБ не выявлено.

Не выявлено значимых отличий между группами по частоте моносомии X, полиплоидий, структурных перестроек хромосом и сочетанных аномалий кариотипа. Статистически значимо чаще у женщин со вторичным ПНБ встречались абортусы с двойными трисомиями, а также с кариотипами, отнесенными к категории «другие» (рис. 4). Абсолютное большинство двойных трисомий было обнаружено в группе абортусов от женщин со вторичным ПНБ (13 из 14 случаев) ($p = 0,0002$). Средний возраст женщин с такими эмбрионами был выше, чем средний возраст по выборке, и составил 39,5 года.

Обсуждение

Сложность прогнозирования и консультирования при такой генетически гетерогенной патологии, как ПНБ, требует учета всех критериев, позволяющих прояснить этиологию невынашивания и оценить вероятность благополучного исхода беременности в дальнейшем. Одним из таких критериев является акушерский анамнез женщины, в частности, наличие или отсутствие в ее анамнезе рождения ребенка. Пристальное внимание предыдущему живорождению уделяется из-за того, что в двух данных группах — с первичным и вторичным ПНБ — возможно, задействованы нарушения различных механизмов и, соответственно, разные подходы к обследованию и лечению могут быть наиболее эффективны.

Корректный сравнительный анализ частоты хромосомной патологии при первичном и вторичном ПНБ может быть осуществлен только в рамках одного исследования. Таких исследований немного, их результаты приведены в табл. 2. Карп с соавторами не выявили различий в частоте хромосомной патологии у абортусов от женщин с первичным и вторичным ПНБ, однако обследованные в работе выборки довольно невелики [9]. В более поздних работах, проведенных на японской и австрийской популяциях, была обнаружена более высокая частота аномальных кариотипов у эмбрионов при

вторичном ПНБ, чем при первичном [10, 11]. Сходные результаты были получены в работе Массальской с соавторами, однако при проведении мультивариантного анализа разница в частотах хромосомных аномалий оказалась связана только с возрастом матери, а не с наличием или отсутствием предыдущего живорождения [12]. В нашем исследовании частота аномалий кариотипа у абортусов из группы с первичным ПНБ также оказалась ниже, чем с вторичным, причем частота эмбрионов с аномальными кариотипами статистически значимо возрастала у женщин старшего возраста при вторичном, но не при первичном ПНБ. Известно, что у женщин после 35 лет заметно увеличивается доля анеуплоидных

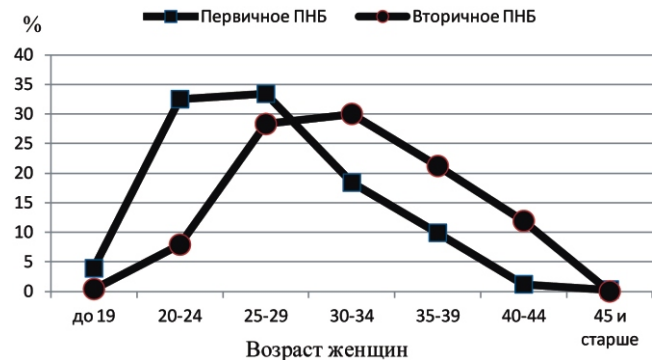


Рис. 1. Распределение возрастов женщин в группах с первичным и вторичным ПНБ.

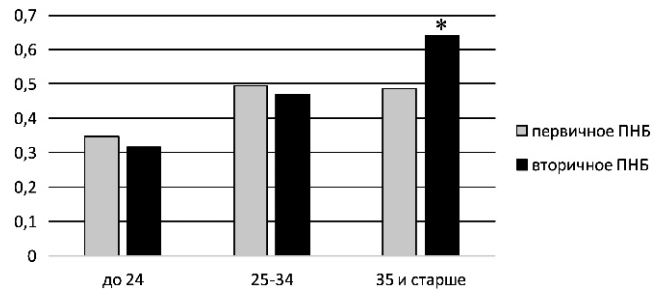


Рис. 2. Сравнение частот аномальных кариотипов абортусов в группах женщин с первичным и вторичным ПНБ, стратифицированных по возрасту. * — статистически значимое возрастание частоты по сравнению с более молодыми женщинами со вторичным ПНБ.

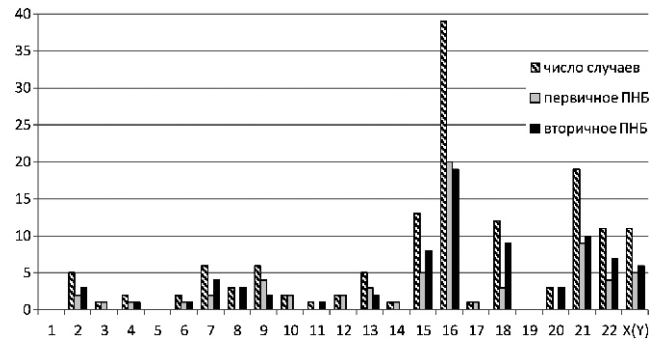


Рис. 3. Вовлеченность индивидуальных хромосом в трисомии у абортусов от женщин с ПНБ.

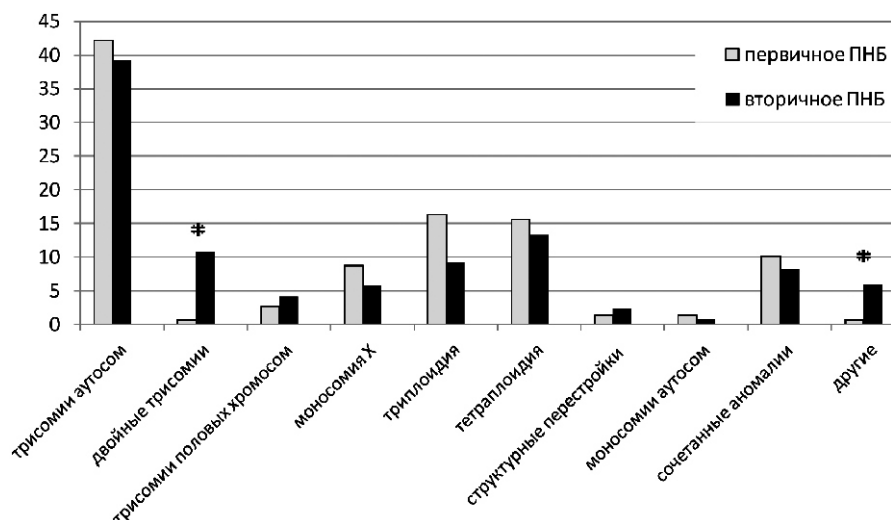


Рис. 4. Частоты аномальных кариотипов абортусов в группах с первичным и вторичным ПНБ. «Сочетанные аномалии» — комбинация трисомий/полиплоидий/моносомий/структурных перестроек у одного абортуса. «Другие» — химеры 46,XX/46,XY и пузырные заносы с нормальным кариотипом. * — статистически значимые отличия по частоте между группами с первичным и вторичным ПНБ.

эмбрионов на преимплантационных этапах развития [13]. Таким образом, можно заключить, что вклад хромосомных аномалий в эмбриональную гибель выше при вторичном ПНБ, и эта разница обусловлена «недостатком» абортусов с аномальными кариотипами у женщин старшего возраста с первичным ПНБ.

Результаты настоящего исследования и данные литературы (как в рамках акушерского обследования женщин, так и при анализе кариотипов и морфологии абортусов) указывают на заметные отличия в патогенезе первичного и вторичного ПНБ. Так, при первичном ПНБ чаще встречаются аномалии матки и антифосфолипидный синдром [10], аллоиммунные аномалии [6], аномальные уровни пролактина [3], гибель морфологически нормальных эмбрионов [11] и наблюдается тенденция к более частому невынашиванию в последующей беременности [6].

Данные, полученные при кариотипировании нескольких абортусов от одной женщины, свидетельствуют о том, что существует довольно высокая частота (около 75%) повторения нормальных либо аномальных кариотипов у эмбрионов [10, 14]. Повторяющаяся ги-

бель эуплоидных эмбрионов свидетельствует о действии перманентных факторов со стороны материнского организма. При нормальном кариотипе абортуса обследование женщин в 85% случаев выявляло «материнский фактор», тогда как при наличии хромосомных аномалий «материнский фактор» выявлялся лишь у 25% женщин [15]. Тот факт, что при первичном ПНБ статистически значимо чаще встречалась повторяющаяся гибель морфологически нормальных эмбрионов [11] также свидетельствует о более выраженной роли материнских факторов в этой группе пациентов.

В настоящем исследовании обнаружена более высокая частота двойных трисомий у абортусов от женщин со вторичным ПНБ. Ранее было обнаружено, что двойные трисомии достоверно чаще выявляются при ПНБ, чем при спорадических абортах [5, 16]. Одной из причин этого может быть носительство женщинами мутаций каких-либо генов, влияющих на частоту возникновения анеуплоидий [17]. Другим вероятным объяснением служит возраст, так как с его увеличением происходит повышение частоты мейотических нарушений в оогенезе [18] и снижение селективной функции эндометрия [19].

Таблица 2

Сравнение вклада хромосомных аномалий эмбриона в этиологию первичного и вторичного ПНБ

Популяция	Первичное ПНБ (n)	Вторичное ПНБ (n)	Различия	Возраст матерей	Исследование
Израиль	26,7% (75)	32% (50)	$p > 0,05$	$31,6 \pm 5,7$	[9]
Япония	39,8% (404)	47,4% (78)	$p = 0,044$	$32,4 \pm 4,45$	[10]
Австрия	56,4% (95)	81,3% (50)	$p < 0,05$	$33,9 \pm 5,6/35,1 \pm 6,1$	[11]
Польша	64,7% (204)	74,4% (164)	$p = 0,046^*$	$34,2 \pm 4,9$	[12]
Россия	43,9% (335)	52,6% (228)	$p = 0,041$	$27,1 \pm 5,5/32,2 \pm 5,5$	Настоящее исследование

Примечание. * — без поправки на возраст женщины; n — объем выборки

Вероятнее всего, высокая частота двойных трисомий при вторичном ПНБ является результатом комбинированного эффекта большего возраста матерей и большего вклада хромосомной патологии в его этиопатогенез.

Список литературы

1. Kolte AM, Nielsen HS, Moltke I, et al. A genome-wide scan in affected sibling pairs with idiopathic recurrent miscarriage suggests genetic linkage. *Mol Hum Reprod.* 2011 Jun;17(6):379-385.
2. Nielsen HS, Steffensen R, Lund M, et al. Frequency and impact of obstetric complications prior and subsequent to unexplained secondary recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2010 Jun;25(6):1543-1552.
3. Shapira E, Ratzon R, Shoham-Vardi I, et al. Primary vs. secondary recurrent pregnancy loss: epidemiological characteristics, etiology, and next pregnancy outcome. *J Perinat Med.* 2012; Feb 29;40(4):389-396.
4. Alberman E. The epidemiology of repeated abortion. In: Beard RW, Sharp F, editors. *Early pregnancy loss: mechanism and treatment.* London: Royal College of Obstetrics and Gynaecology Press; 1988. pp. 9 — 17.
5. Ogasawara M, Aoki K, Okada S, Suzumori K. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil. Steril.* 2000 Feb;73(2):300-304.
6. Lee GS, Park JC, Rhee JH, Kim JI. Etiologic characteristics and index pregnancy outcomes of recurrent pregnancy losses in Korean women. *Obstet Gynecol Sci.* 2016 Sep;59(5):379-387.
7. Egerup P, Kolte AM, Larsen EC, et al. Recurrent pregnancy loss: what is the impact of consecutive versus non-consecutive losses? *Hum Reprod.* 2016 Nov;31(11):2428-2434.
8. Лебедев ИН, Никитина ТВ. Цитогенетика нарушений эмбрионального развития человека (Наследственность и здоровье): учебно-методическое пособие — Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2013. — 124 с.
9. Carp H, Toder V, Aviram A, et al. Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage. *Fertil Steril.* 2001 Apr;75(4):678-682.
10. Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, et al. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2012 Aug;27(8):2297-2303.
11. Feichtinger M, Wallner E, Hartmann B, et al. Transcervical embryoscopic and cytogenetic findings reveal distinctive differences in primary and secondary recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2017 Jan;107(1):144-149.
12. Massalska D, Bijok J, Kucinska-Chahwan A, et al. Chromosomal abnormalities in the first-trimester spontaneous pregnancy loss. *Austin J Obstet Gynecol.* 2018; 5(6): 1116.
13. Demko ZP, Simon AL, McCoy RC, et al. Effect of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-chromosome single-nucleotide polymorphism — based preimplantation genetic screening. *Fertil Steril.* 2016 May;105(5):1307-1313.
14. Никитина ТВ, Жигалина ДИ, Саженова ЕА, и др. Неслучайное распределение кариотипов эмбрионов у женщин с привычным невынашиванием беременности. *Медицинская генетика.* 2018;17(1):50-56.
15. Popescu F, Jaslow CR, Kutteh WH. Recurrent pregnancy loss evaluation combined with 24-chromosome microarray of miscarriage tissue provides a probable or definite cause of pregnancy loss in over 90% of patients. *Hum Reprod.* 2018 Apr 1;33(4):579-587.
16. Nikitina TV, Sazhenova EA, Tolmacheva EN, et al. Comparative cytogenetic analysis of spontaneous abortions in recurrent and sporadic pregnancy losses. *Biomed Hub.* 2016; 1: 446099.
17. Lenzi ML, Smith J, Snowden T, et al. Extreme heterogeneity in the molecular events leading to the establishment of chiasmata during meiosis I in human oocytes. *Am J Hum Genet.* 2005 Jan;76:112-127.
18. Kurahashi H, Tsutsumi M, Nishiyama S, et al. Molecular basis of maternal age-related increase in oocyte aneuploidy. *Congenit Anom (Kyoto).* 2012 Mar;52(1):8-15.
19. Coulam C. What about superfertility, decidualization, and natural selection? *J Assist Reprod Genet.* 2016 May;33(5):577-580.