

Сравнительный анализ цитогенетического исследования и хромосомного микроматричного анализа биологического материала при невынашивании беременности

Кудрявцева Е.В.¹, Ковалев В.В.¹, Потапов Н.Н.², Канивец И.В.³,
Антонец А.В.³, Коновалов Ф.А.³, Пьянков Д.В.³, Коростелев С.А.³

¹ Уральский государственный медицинский университет, кафедра акушерства и гинекологии ФПК и ПП и педиатрического факультета

² Муниципальное автономное учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница № 40», г. Екатеринбург

³ ООО «Геномед», г. Москва
elenavladpopova@yandex.ru

Для анализа хромосомного набора у абортрованного эмбриона при невынашивании беременности используются различные методы исследования. Одним из современных методов диагностики является хромосомный микроматричный анализ (ХМА). Определение диагностической эффективности ХМА в сравнении со стандартным кариотипированием представляет научный и практический интерес. Цель исследования: сравнение результатов ХМА и кариотипирования при анализе абортного материала от женщин с невынашиванием беременности. Сравнительный анализ обсуждаемых методов диагностики выполнен на основании исследования абортного материала от 885 женщин. В 1-ю группу вошли 632 женщины, чей абортный материал был направлен на ХМА. Вторую группу составили 253 женщины, материал которых был направлен на цитогенетическое исследование. Достоверных различий между исследуемыми группами по доле образцов с нормальным и патологическим хромосомным набором не выявлено. Однако структура хромосомных аномалий в исследуемых группах различалась. В обеих группах в большинстве случаев встречались трисомии аутосом: в первой группе — 33,5% и второй группе — 28,5% от всех образцов. Структурные аномалии достоверно чаще встречались при использовании ХМА — 4,4% от всех результативных исследований в 1 группе, и всего 0,8% (2 случая) во 2 группе. Выявлена более высокая частота полиплоидий при проведении цитогенетического исследования. В 1 группе триплоидия обнаружена в 5,8% случаев, а тетраплоидия — в 0,5%. Во 2-й группе триплоидия выявлена в 10,0%, а тетраплоидия — в 5,2% случаев. Выводы: традиционное кариотипирование и ХМА имеют специфические преимущества и недостатки. Количество хромосомных аномалий, выявляемых данными методами, примерно одинаково, но структура этих аномалий различается. В проведенном исследовании ХМА выявил большее количество структурных перестроек, тогда как при кариотипировании было выявлено больше множественных аномалий и полиплоидий. Выявление структурных аномалий имеет большее клиническое значение, так как они могут свидетельствовать о несбалансированной транслокации, имеющей наследственный характер. Невозможность детекции методом ХМА сбалансированных хромосомных аномалий относится к недостатку метода, но клинически не столь существенна.

Ключевые слова: ХМА, кариотип, невынашивание беременности, хромосомные аномалии, синдром Дауна.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Comparative analysis of standard karyotyping and chromosomal microarray analysis of products of conception obtained with miscarriage

Kudryavtseva E.V.¹, Kovalev V.V.¹, Potapov N.N.², Kanivets I.V.³,
Antonets A.V.³, Pyankov D.V.³, Konovalov F.A.³, Korostelev S.A.³

¹ Ural State Medical University, Department of obstetrics and gynecology, faculty of postgraduate education, Ekaterinburg

² City Clinical Hospital №40, Ekaterinburg

³ «Genomed» Ltd, Moscow

There are various methods for the analysis of chromosomal rearrangements in embryos aborted in miscarriage. Chromosomal microarray analysis is one of the modern diagnostic methods. Studies to determine the diagnostic yield of CMA in comparison to standard karyotyping are of significant scientific and practical interest. **Aim.** The aim of the present study is to compare the results of CMA and karyotyping of products of conception from women with miscarriage. **Materials and methods.** A comparative analysis of the two diagnostic methods is based on the study of abortive material from 885 women. In 1st group, 632 women whose products of conception were analysed by CMA were included. The 2nd group comprised 253 women, whose material was directed to a cytogenetic study. **Results and discussion.** There were no significant differences between study groups in the proportions of samples with a normal and pathological chromosome set. However, the structure of chromosomal abnormalities spectrum in the study groups was different. In both groups, autosomal trisomies were found most frequently — 33.5% in the 1st group and 28.5% in the 2nd group among all the samples. Structural anomalies were significantly more frequent when using CMA — 4.4% of all effective studies in group 1, and only 0.8% (2 cases) in group 2. A higher frequency of polyploidy was revealed during cytogenetic examination. In the 1st group, triploidy

was found in 35.8% cases, and tetraploidy in 0.5%. In the 2nd group, triploidy was detected in 10.0%, and tetraploidy — in 5.2% of cases. **Conclusions.** Traditional karyotyping and CMA have specific relative advantages and disadvantages. The number of chromosomal abnormalities detected using these methods is approximately the same, but the spectrum of these anomalies is different. CMA reveals structural rearrangements more often, while karyotyping reveals more cases of multiple anomalies and polyploidy. Identification of structural anomalies has greater clinical significance since it may indicate an unbalanced translocation that is hereditary. The impossibility of detecting balanced translocations with CMA is a limitation of the method that is not as much clinically relevant since it is extremely rare in this type of material.

Keywords: CMA, karyotype, miscarriage, chromosomal abnormalities, Down syndrome.

Введение

Роль хромосомных aberrаций у эмбриона в генезе невынашивания беременности считается доказанной, достигая 50—65% в общей структуре этиопатогенетических факторов [1—3]. Для установления истинной причины данной патологии используются различные методы исследования хромосомного набора у абортированного эмбриона. Чаще всего применяется стандартное кариотипирование, поскольку это наиболее дешевый и доступный метод исследования из существующих диагностических процедур и его возможности при анализе абортингового материала достаточно хорошо изучены [2, 3]. При этом проведение стандартного кариотипирования в ряде регионов нашей страны сопряжено с медико-организационными и технологическими проблемами, поскольку не все медицинские учреждения, где проводится эвакуация продуктов зачатия из полости матки, располагают возможностью проводить генетические исследования, доставка же материала в специализированную лабораторию в рекомендованные сроки затруднена в связи с ограниченным сроком хранения биологического материала. При нарушении сроков хранения существенно снижаются шансы добиться получения клеточной культуры и получить результат анализа. Однако в последние годы появились более современные методы, например, хромосомный микроматричный анализ (ХМА) с использованием SNP-матриц или сравнительная геномная гибридизация. При проведении ХМА, так же, как и при сравнительной геномной гибридизации, допускается хранение нативного материала до 48 часов, поэтому есть возможность транспортировки биологического материала из любого региона России, что делает данное исследование более доступным, чем традиционное кариотипирование. Кроме того, существует принципиальная возможность проведения анализа на архивных образцах (тканях, обработанных формалином и на срезах парафиновых блоков).

ХМА — это полногеномный анализ с высокой разрешающей способностью, использующийся для определения хромосомных аномалий, как тех, которые определяются путем стандартного цитогенетического исследования, так и субмикроскопических делеций и дупликаций (вариации числа копий — CNVs). Опыт, накопленный в течение последнего десятилетия, демонстрирует лучшее выявление хромосомных аномалий при проведении ХМА по сравнению с традиционным кариотипировани-

ем [1, 4—8]. Помимо более высокой разрешающей способности, ХМА имеет и ряд дополнительных преимуществ перед стандартным кариотипированием: более короткий срок выполнения анализа, отсутствие необходимости культивирования клеток, возможность отсроченной диагностики и, следовательно, транспортировки материала на значительные расстояния, возможность проведения анализа на архивных образцах [4, 7, 8]. Тем не менее, ХМА имеет и определенные недостатки по сравнению с традиционным цитогенетическим исследованием: не выявляются сбалансированные структурные перестройки (инверсии, транслокации), не определяется мозаицизм низкого уровня (ниже 5—10%). ХМА не дает информацию о структуре хромосом и конкретной локализации генетического дисбаланса. Например, при увеличении интенсивности сигнала от хромосомы 21 методом ХМА нельзя дифференцировать трисомию данной хромосомы от несбалансированной Робертсоновской транслокации. В связи с этим в настоящее время ХМА не рекомендован в качестве теста первой линии для определения причин невынашивания беременности в первом триместре из-за ограниченного объема информации. Тем не менее, исследования, касающиеся применения ХМА для анализа продуктов зачатия, активно проводятся [4, 5].

Исходя из вышеизложенного мы полагаем, что дальнейшие исследования для определения диагностической ценности ХМА в сравнении со стандартным кариотипированием представляют научный и практический интерес, поскольку анализ хромосомного набора плода позволяет понять причины невынашивания беременности и оптимизировать алгоритм обследования при подготовке к следующей беременности, что позволяет значительно снизить стоимость клинических услуг в будущем.

Таким образом, целью исследования явилось сравнение диагностической ценности ХМА и стандартного цитогенетического исследования при анализе абортингового материала от женщин с невынашиванием беременности в первом триместре.

Материалы и методы исследования

Сравнительный анализ эффективности обсуждаемых методов генетической диагностики выполнен на основании исследования абортингового материала от 885 жен-

щин. В 1 группу вошли 632 женщины, чей абортивный материал был направлен на ХМА. Вторую группу составили 253 женщины, биологический материал которых был направлен на цитогенетическое исследование. Обе группы набирались в Москве и в Екатеринбурге, все пациентки принадлежали к славянской популяции. Для анализа использовались ткани хориона. В обеих группах для диагностики использовались только свежие образцы нативного биологического материала. Критериями включения в исследуемые группы были: неразвивающаяся беременность до 12 недель (срок беременности определялся по УЗИ с измерением копчико-теменного размера), заинтересованность пациентки в вынашивании беременности. Критериями исключения из исследования были: воздействие облигатных тератогенов при беременности, тяжелая соматическая патология, острый инфекционный процесс половых путей. Набор материала осуществлялся на базе медико-генетического центра «Геномед» (г. Москва), и кафедры акушерства и гинекологии ФПК и ПП и педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Екатеринбург).

При проведении ХМА использовались SNP-олигонуклеотидные микроматрицы Cytoscan Optima (Thermo Fisher, США) с разрешающей способностью от 800 000 п.н. (в отдельных клинически значимых регионах от 500 000 п.н.). Выделение и анализ ДНК проводились в соответствии с протоколом производителя реагентов. Определение вариаций числа копий (CNVs) производилось путем измерения интенсивности сигнала с зондов. С помощью данного типа матриц, помимо определения CNVs, возможно определение полиплоидии и однородительской дисомии (в отличие от сравнительной геномной гибридизации, при которой определяются только вариации числа копий).

Препараты для цитогенетического исследования получали по стандартной методике. Исследование выполнялось в три этапа:

1. Подготовка клеточного материала: стимуляция деления клеток (культивирование), остановка деления, обработка гипертоническим раствором, удаление лишних клеток, центрифугирование;

2. Подготовка хромосомного препарата: фиксация смесью уксусной кислоты и этилового спирта, нанесение на предметные стекла, окрашивание препарата;

3. Собственно микроскопия с компьютерной обработкой изображения и составление заключения.

Окрашивание препарата выполнялось стандартным дифференциальным способом (G-методом). Для уточнения вариабельности хромосомного набора использовался С-метод окраски препарата (окрашивался только конститутивный гетерохроматин). Далее выполнялась компьютерная обработка изображения с идентификацией хромосом.

Статистический анализ проводился с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel. Среди

методов описательной статистики приведены среднее арифметическое и его ошибка ($M \pm m$), абсолютные и относительные частоты для номинальных признаков. Для оценки достоверности выявленных различий между исследуемыми группами использовался анализ таблиц сопряженности и критерий χ^2 Пирсона, статистическую значимость оценивали точным методом Фишера. Критическое значение уровня значимости (p) принималось равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Средний возраст женщин в исследуемых группах не имел существенных различий и составил соответственно $33,1 \pm 5,4$ года и $31,5 \pm 5,6$ лет ($p > 0,05$). Средний срок беременности также различался незначительно — соответственно 7 недель 3 дня и 7 недель 5 дней в 1 и 2 группах. В 1 группе невынашивание в анамнезе имели 217 пациенток (34,2%), причем 26 пациенток (4,4%) уже имели ранее 2 или более случая невынашивания беременности (привычное невынашивание), 81 беременность (12,8%) среди исследуемых случаев наступила в результате применения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Во 2 группе ранее страдали невынашиванием беременности 94 пациентки (37,1%), привычным невынашиванием — 15 (6%) пациенток, беременность наступила в результате ВРТ у 29 (11,5%) пациенток. Достоверных различий в исследуемых группах по данным акушерского анамнеза не было. Таким образом, исследуемые группы были сопоставимыми.

В первой группе (табл. 1) анализ не удалось провести у 47 женщин (7,4%) из-за низкого качества ДНК, невозможности идентифицировать генетический материал или недостаточного количества материала. Во второй группе исследование не было проведено из-за низкого качества биологического материала или неудач культивирования или оказалось неинформативным у 43 женщин (16,9%), $p < 0,01$. Таким образом, при использовании ХМА неудачи при проведении анализа бывают более чем в 2 раза реже.

Частота хромосомных аномалий оказалась высокой в обеих исследуемых группах. При проведении ХМА нормальный молекулярный кариотип был определен в 253 образцах (43,2%), а патологический — в 332 случаях (56,8%). При проведении цитогенетического исследования нормальный и патологический хромосомный набор были определены соответственно в 85 и 125 случаях (40,5% и 59,5%). Достоверных различий между исследуемыми группами по количеству образцов с нормальным и патологическим хромосомным набором не выявлено. Однако структура хромосомных аномалий в исследуемых группах демонстрировала существенные различия по некоторым составляющим.

Результаты, полученные при анализе абортивного материала в исследуемых группах, представлены в табл. 2.

Количество анеуплоидий аутосом и гоносом существенно не различалось в исследуемых группах. В обеих группах в большинстве случаев встречались трисомии аутосом: в первой группе — 33,5% и во второй группе — 28,5% образцов (среди выявленных аномалий в исследуемых группах соответственно 59% и 48%). Среди трисомий аутосом чаще всего выявлялись трисомии хромосом 16, 21 и 22, что согласуется с данными литературы [1, 3, 4, 9]. При этом при невынашивании беременности в абортном материале нередко диагностируются трисомии, совместимые с живорождением (табл. 3). Частота данных нарушений в исследуемых группах оказалась сопоставимой и не имела достоверных различий.

Моносомии аутосом встречались очень редко — ни одного случая в группе, где проводилось кариотипирование и 5 случаев в группе, где исследование проводилось методом ХМА (1 случай мозаичной моносомии 18 хромосомы и 4 случая моносомии 21 хромосомы, 2 из которых также были представлены мозаичными вариантами). Считается, что формирование бластоцисты невозможно при большинстве моносомий аутосом, поэтому в этом случае чаще всего происходят предимплантационные потери [9].

Частота анеуплоидий гоносом (половых хромосом) также не имела достоверных различий в исследуемых группах. В основной группе чаще всего встречалась моносомия X-хромосомы — в 42 случаев (7,2% от всех полученных результатов), в двух образцах выявлена трисомия X-хромосомы у эмбрионов женского пола (0,3%) и в пяти — дисомия X-хромосомы у эмбриона мужского

пола (0,8%). В группе сравнения при проведении цитогенетического исследования в этой группе встречалась только моносомия X-хромосомы — 16 случаев (7,6%). Согласно данным научной литературы, эта аномалия является одной из наиболее часто обнаруживаемых в абортном материале при невынашивании беременности, несмотря на то, что моносомия X (синдром Тернера) совместима с живорождением и жизнеспособностью в постнатальном периоде [1, 3, 4, 6, 9, 10].

Структурные аномалии достоверно чаще встречались при использовании ХМА — 26 случаев (4,4% от всех результативных исследований, 7,8% среди выявленных хромосомных аномалий в этой группе). Это объясняется более высокой разрешающей способностью данного исследования — большинство выявленных перестроек из-за субмикроскопического размера невозможно было бы обнаружить при традиционном цитогенетическом исследовании. В группе, где проводилось цитогенетическое исследование, выявлено всего 2 структурные перестройки (0,8%), причем одна из них (0,4%) — сбалансированная робертсоновская транслокация, которая не была бы обнаружена при ХМА.

Обращает на себя внимание более высокая частота полиплоидий при проведении цитогенетического исследования. В первой группе триплоидия обнаружена в 34 (5,8%) случаев, а тетраплоидия — в 3 (0,5%). Среди случаев триплоидии в этой группе было 4 случая, где триплоидия сочеталась с анеуплоидией аутосом (2 случая гипертриплоидии и 2 гипотриплоидии). При этом во второй группе триплоидия выявлена в 10,0%, а

Количество успешно проведенных и не результативных анализов в исследуемых группах

Результат	Группа 1, N = 632		Группа 2, N = 253		χ^2	p
	Абс.	%	Абс.	%		
Результат получен	585	92,6	210	83,1	18,07	p<0,01
Исследование не проведено	47	7,4	43	16,9		

Таблица 1

Результаты анализа хромосомного набора в абортном материале при использовании ХМА и стандартного кариотипирования

Результат исследования	Группа 1, N = 585		Группа 2, N = 210		χ^2	p
	Абс.	%	Абс.	%		
Трисомии аутосом	196	33,5	60	28,5	1,72	p>0,05
Моносомии аутосом	5	0,8	0	—	1,81	p>0,05
Анеуплоидии гоносом	49	8,4	16	7,6	0,11	p>0,05
Множественные анеуплоидии	19	3,2	15	7,1	5,72	p<0,05
Триплоидия (включая гипер- и гипотриплоидию)	34	5,8	21	10,0	4,21	p<0,05
Тетраплоидия	3	0,5	11	5,2	19,9	p<0,001
Структурные аномалии	26	4,4	2	0,9	5,54	p<0,05
Норма	253	43,2	85	40,5	0,48	p>0,05

Таблица 2

Таблица 3

Частота трисомий, совместимых с живорождением

Тип трисомии	Группа 1			Группа 2			p
	Общее количество	Частота среди выявленных нарушений, %, N = 332	Частота среди всех образцов, %, N = 585	Общее количество	Частота среди выявленных нарушений, N = 125	Частота среди всех образцов, N = 210	
Трисомия 8 (синдром Варкани)	6	1,8	1,0	1	0,8	0,5	>0,05
Трисомия 13 (синдром Патау)	10	3,0	1,7	1	0,8	0,5	>0,05
Трисомия 18 (синдром Эдвардса)	5	1,5	0,8	5	4	2,4	>0,05
Трисомия 21 (синдром Дауна)	17	5,1	2,9	10	8	3,8	>0,05
Трисомия 22 (синдром кошачьего глаза)	28	8,4	4,8	4	3,2	1,9	>0,05
Итого	66	19,8	11,3	21	16,8	9,1	>0,05

тетраплоидия — в 5,2% случаев. Выявленные различия статистически достоверны ($p < 0,05$). По-видимому, чувствительность ХМА в отношении тетраплоидии ниже, чем при стандартном цитогенетическом исследовании. Однако в литературе описано сравнение традиционного кариотипирования и FISH-диагностики [11]. При FISH-диагностике уровень тетраплоидии также оказался существенно ниже, чем при цитогенетическом исследовании, где проводится культивирование клеток. Существует гипотеза о полиплоидизации фибробластов плацентарных тканей в ходе их пролиферации *in vitro*. В ряде исследований показано, что в некультивируемых клетках трофобласта эмбриона частота тетраплоидии намного ниже, чем в культивируемых [4, 10, 11, 12]. Этим же можно объяснить и большее количество множественных анеуплоидий при проведении кариотипирования. Эти данные ставят под сомнение достоверность метода стандартного кариотипирования и требуют проведения отдельных целенаправленных исследований для подтверждения этого предположения.

Таким образом, общая частота хромосомных аномалий, выявляемая тем и другим методами примерно одинакова, однако структура хромосомных аномалий имеет различия. При кариотипировании чаще выявляется полиплоидия, возможно выявление сбалансированных транслокаций (которые, однако, в абортном материале при невынашивании беременности встречаются крайне редко). При ХМА чаще определяются структурные перестройки, в том числе несбалансированные транслокации, которые могут носить наследственный характер, и выявление которых крайне важно для последующего медико-генетического консультирования и расчета риска привычной потери беременности и рождения детей с генетической патологией.

Список литературы

1. Никитина ТВ, Кашеварова АА, Скрыбин НА. Молекулярное кариотипирование (ACGH) как современный подход к исследованию причин невынашивания беременности. Медицинская Генетика. 2013;127(1):26-35.
2. Сидельникова ВМ, Сухих ГТ. Невынашивание беременности. Руководство для врачей. М.: МИА. 2011. — 536 с.
3. Hardy K, Hardy PJ, Jacobs PA et al. Temporal changes in chromosome abnormalities in human spontaneous abortions: Results of 40 years of analysis. Am J Med Genet A. 2016;170(10):2671-80.
4. Sahoo T, Dzidic N, Strecker MN et al. Comprehensive genetic analysis of pregnancy loss by chromosomal microarrays: outcomes, benefits and challenges. Genet Med. 2016.
5. Dugoff L, Norton ME, Kuller JA. The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis. Am J Obstet Gynecol. 2016 Oct;215(4):B2-9.
6. Chu Y, Wu D, Hou QF. et al. Application of array-based comparative genomic hybridization technique in genetic analysis of patients with spontaneous abortion. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2016;51(8):592-596.
7. Lin SB, Xie YJ, Chen Z. et al. Improved assay performance of single nucleotide polymorphism array over conventional karyotyping in analyzing products of conception. J Chin Med Assoc. 2015;78(7):408-13.
8. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. N Engl J Med. 2012;367:2175-84.
9. Кудрявцева ЕВ., Ковалев ВВ., Канивец ИВ., Коростелев СА. Современные возможности выявления хромосомных аномалий в абортном материале. Уральский медицинский журнал. 2016;11:5-8.
10. Бочков НП, Гинтер ЕК, Пузырев ВП. Наследственные болезни: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 936 с.
11. Кашеварова АА, Суханова НН, Толмачева ЕН и др. Ретроспективная молекулярно-цитогенетическая характеристика тетраплоидии при ранней эмбриональной летальности у человека. Цитология. 2007;49(4):322-328.
12. Lomax B., Tang S., Separovic E. et al. Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions. Am J Hum Genet. 2000;66(5):1516-21.