



Исследование хромосомной патологии в клетках неразвивающегося хориона методом высокопроизводительного секвенирования

Ж. И. Глинкина, М. А. Курцер, И. В. Будник

Перинатальный медицинский центр «Мать и дитя», г. Москва

Цель исследования: определить частоту и структуру хромосомных нарушений методом высокопроизводительного секвенирования (next-generation sequencing — NGS) в клетках хориона при неразвивающейся беременности.

Материалы и методы. От женщин с неразвивающейся беременностью в возрасте от 18 до 45 лет (средний возраст — 34,3 года) были получены и исследованы 197 образцов хориона и 2 образца ткани мышцы плода. Диагностику проводили методом NGS. Контрольным материалом служили клетки хориона с известной патологией, полученные хирургическим путем в ходе прерывания беременности по желанию пациентки.

Результаты. Хромосомная патология была обнаружена в 122 (61,3%) образцах из 199. Анеуплоидия по одной хромосоме имела место в 100 (82,0%) наблюдениях, патология с вовлечением двух хромосом — в 7 (5,7%), триплоидный набор — в 9 (7,4%), сочетание анеуплоидии с мозаицизмом — в 6 (4,9%). Наибольшей была доля трисомии хромосом — 76%. Моносомии в основном были представлены отсутствием одной из половых хромосом. Чаще патологические изменения наблюдали по 16, 22 хромосомам и одной из половых хромосом.

Заключение. NGS является высокоэффективным современным методом диагностики анеуплоидий и может быть предложено не только для исследования клеток неразвивающегося хориона, но и в качестве профилактического метода при проведении пренатальной диагностики.

Ключевые слова: next-generation sequencing, высокопроизводительное секвенирование, невынашивание беременности, неразвивающаяся беременность.

Next-Generation Sequencing for Evaluation of Chromosomal Abnormalities in the Cells of Non-Viable Chorionic Villi

Zh. I. Glinkina, M. A. Kurtser, I. V. Budnik

Mother and Baby Perinatal Medical Center, Moscow

Study Objective: To determine the frequency and types of chromosomal abnormalities in chorionic cells in non-viable pregnancy using next-generation sequencing (NGS).

Materials and Methods: One hundred and ninety-seven samples of chorionic villi and two samples of fetal muscle tissue were collected from women with non-viable pregnancies, aged 18 to 45 (mean age, 34.3 years). Diagnosis was made using NGS. Chorionic villi cells with known abnormalities, collected during surgical abortion procedures performed at patients' request, were used as control material.

Study Results: Chromosomal abnormalities were detected in 122 (61.3%) of the 199 samples. One extra or missing chromosome (aneuploidy) was found in 100 cases (82.0%), abnormality affecting two chromosomes in seven cases (5.7%), triploidy in nine cases (7.4%), and a mosaic aneuploidy in six cases (4.9%). Trisomy was detected in 76% of the cases, and was the most common abnormality. A missing sex chromosome was the most common type of monosomy. Abnormalities affecting chromosomes 16, 22, and one of the sex chromosomes were seen most frequently.

Conclusion: NGS is an state-of-the-art highly effective tool for detecting aneuploidy. It may be recommended not only as a method for evaluating non-viable chorionic villi cells, but also as a prevention method in prenatal diagnosis.

Keywords: next-generation sequencing, miscarriage, non-viable pregnancy.



Частота невынашивания желанных беременностей в популяции на протяжении многих лет составляет 15–25% [1–3]. Одним из методов исследования причин неразвивающейся беременности при невынашивании является изучение кариотипа плода. В настоящее время знания о хромосомном наборе абортусов после спонтанного прерывания беременности могут быть полезными при выборе последующей тактики лечения таких пациенток.

Чаще всего (75–80%) прерывание беременности происходит в I триместре. В основе невынашивания беременности в этих случаях могут лежать как генетические отклонения в эмбрионе, так и многоплодие, хронические инфекции, анатомические особенности матки, гормональные нарушения и т. д.

По данным литературы, в популяции до 50–60% ранних выкидышей связаны с хромосомными аномалиями. Многие авторы утверждают, что спонтанные абортусы до 12 недель беременности являются хорошим индикатором генетических

нарушений в эмбрионе [4–8]. Несмотря на то что к настоящему времени проведена серия масштабных цитогенетических исследований клеток спонтанных абортусов, существует ряд данных, противоречащих друг другу, касающихся частоты и спектра хромосомных нарушений у эмбрионов при неразвивающейся беременности.

Молекулярные методы исследования хромосомной патологии в различных тканях находят все более широкое применение в диагностике [5]. Это связано с тем, что при их использовании нет необходимости культивировать клетки. Классическим цитогенетическим методом не всегда удается получить результат. Зачастую это связано с низкой пролиферацией или ее отсутствием в исследуемых клетках.

Цель исследования: определить частоту и структуру хромосомных нарушений методом высокопроизводительного секвенирования (next-generation sequencing — NGS) в клетках хориона при неразвивающейся беременности.

Будник Ирина Васильевна — д. м. н., заведующая отделением гинекологии ПМЦ «Мать и дитя». 117209, г. Москва, Севастопольский пр-т, д. 24, кор. 1. E-mail: irina_budnik@bk.ru

Глинкина Жанна Ивановна — д. б. н., заведующая лабораторией молекулярной генетики ПМЦ «Мать и дитя». 117209, г. Москва, Севастопольский пр-т, д. 24, кор. 1. E-mail: janna435@yandex.ru

Курцер Марк Аркадьевич — академик РАН, д. м. н., профессор, директор филиала МД МЕДИКАЛ ГРУПП ИНВЕСТМЕНТС ПЛС (ГК «Мать и дитя»). 117209, г. Москва, Севастопольский пр-т, д. 24, кор. 1. E-mail: m.kurtser@mcclinics.ru

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

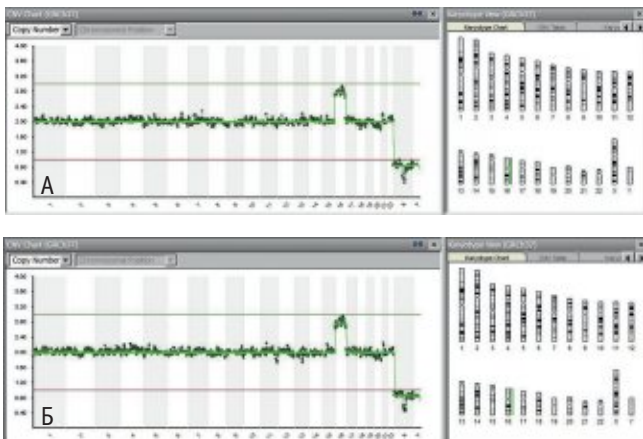
Контрольным материалом служили клетки хориона с известной патологией (была проведена предварительная пренатальная диагностика), полученные хирургическим путем в ходе прерывания беременности по желанию пациентки. Во всех случаях результаты цитогенетического исследования совпали с результатами секвенирования. Образцы, полученные от женщин с неразвивающейся беременностью, доставлялись в лабораторию в изотоническом физиологическом растворе при температуре +4 °С.

Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из клеток хориона или мышцы плода. Всего были исследованы 197 образцов хориона и 2 образца ткани мышцы плода, полученные от женщин в возрасте от 18 до 45 лет (средний возраст — 34,3 года). Пять образцов проанализировали дополнительно из высушенного хориона на специализированных картах для сбора биологических образцов производства компании «АлкорБио», г. Санкт-Петербург (карта представлена на рисунке 1, результаты — на рисунке 2). Средний срок прерывания беременности составил $8,5 \pm 2,1$ недели (от 5 до 16 недель).

Рис. 1. Расположение хориона на специализированной карте для хранения биологического материала. Здесь и далее в статье фото авторов



Рис. 2. Результат исследования клеток неразвивающегося хориона, взятого из физического раствора (А) и высушенного на специализированной карте (Б). Выявлена трисомия 16 хромосомы



ДНК из клеток получали стандартным методом выделения ДНК наборами компании Promega (США). Секвенирование проводили согласно технологии Illumina на приборе MiSeq. Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения BlueFluse Multi.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Хромосомная патология была обнаружена в 122 (61,3%) образцах из 199. Частота встречаемости патологии у женщин разного возраста приведена в таблице.

Анеуплоидия по одной хромосоме была обнаружена в 100 (82,0%) наблюдениях, патология с вовлечением двух хромосом — в 7 (5,7%), триплоидный набор — в 9 (7,4%), сочетание анеуплоидии с мозаицизмом — в 6 (4,9%).

По частоте встречаемости трисомия хромосом заняла лидирующее место — 76%. Моносомии в основном были представлены отсутствием одной из половых хромосом (15 наблюдений). Только в одном наблюдении моносомия была представлена 21 хромосомой (рис. 3).

Дубликации/делеции (рис. 4) и мозаицизм были выявлены в одинаковом количестве — 4%. Наиболее часто патологические изменения наблюдались по 16, 22 хромосомам и одной из половых хромосом (20%, 12,9% и 17,1%, соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показали, что хромосомные нарушения плода обнаружены у 72,0% женщин старше 40 лет. Высокий процент генетической патологии у этой категории пациенток отмечен и другими авторами [4, 5]. Сравнение кариотипа у абортусов женщин различных возрастных групп показало увеличение частоты хромосомной патологии в зависимости от возраста женщин. Т. В. Золотухина и соавт. (2003) также отметили данную зависимость [9].

Согласно результатам анализа, у пациенток 20–30 лет преобладали абортусы с нормальным кариотипом, 31–40 лет —

Таблица

Частота хромосомной патологии в клетках хориона и мышце плода у женщин различных возрастных групп

Возрастная группа	Процент выявленной патологии
Моложе 35 лет	55,6
35–40 лет	60,0
Старше 40 лет	72,0

Рис. 3. Структура хромосомной патологии, выявленной методом высокопроизводительного секвенирования

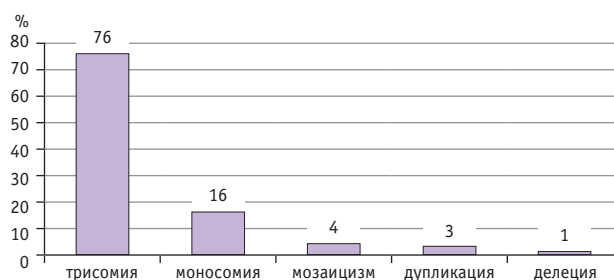
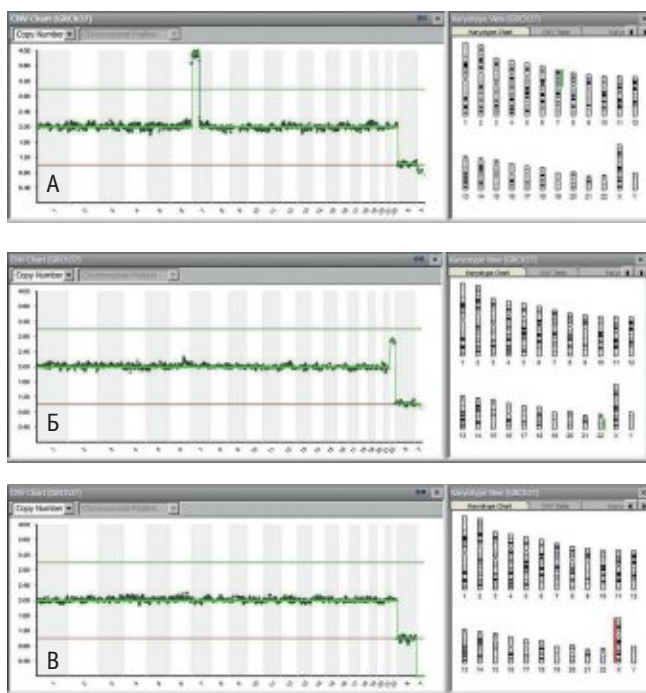


Рис. 4. Результаты исследования клеток неразвивающегося хориона. Выявлены четыре копии короткого плеча 4 хромосомы (А), трисомия 22 хромосомы (Б), отсутствие генетического материала, соответствующего одной из половых хромосом (В)



плоды с хромосомными aberrациями, у женщин старше 40 лет все плоды имели аномальный кариотип.

В другом исследовании сделано заключение, что у 82% пациенток старше 40 лет потеря беременности может быть связана с изменениями в кариотипе эмбриона [3].

Небольшое количество выявленных моносомий указывает на то, что эмбрионы с такой патологией имеют низкий потен-

циал развития. В структуре моносомий отсутствие одной из половых хромосом занимает почти 100%.

Анеуплоидии в клетках хориона одновременно по двум хромосомам, делеции/дупликации встречались достаточно редко, это тоже свидетельствует, что данная патология может оказывать негативное влияние на потенциал развития эмбриона.

Полученные данные показывают, что необходимо обращать внимание на возраст пациенток при планировании беременности, как при естественном зачатии, так и при проведении программы ВРТ. Женщинам с бесплодием старше 35 лет следует предлагать проведение программы ЭКО с предимплантационным скринингом эмбрионов на анеуплоидии. Перенос одного здорового эмбриона не только позволит родить ребенка без патологии, но и предупредить прерывание беременности большим плодом, которое может негативно сказаться на физическом и психическом здоровье женщины.

Идентичные профили при исследовании свежего и высушенного на карте материала, полученные нами однозначные данные говорят о том, что клетки высушенного хориона на карте для хранения биологического материала не влияют на результат анализа и карты возможно использовать для хранения материала в тех случаях, когда невозможна его транспортировка в ближайшее время.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование клеток неразвивающегося хориона вносит большой вклад в понимание процесса мейоза и, что немаловажно, может способствовать разработке профилактических мероприятий по предотвращению невынашивания беременности как при естественном зачатии, так и в рамках программы ВРТ.

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что высокопроизводительное секвенирование (next-generation sequencing) является высокоэффективным современным методом диагностики анеуплоидий и может быть предложено не только для исследования клеток неразвивающегося хориона, но и в качестве профилактического метода при проведении пренатальной диагностики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тишкевич О. Л., Жуковская С. В., Шелег С. Б., Илькевич Н. Е., Мальшева Е. В., Семенов А. В. и др. Невынашивание беременности после ЭКО и ЭКО/ИКСИ. Пробл. репродукции. 1998; 6: 21. [Tishkevich O. L., Zhukovskaja S. V., Sheleg S. B., Il'kevich N. E., Malysheva E. V., Semenov A. V. i dr. Nevynashivanie beremennosti posle JeKO i JeKO/IKSI. Probl. reprodukcii. 1998; 6: 21. (in Russian)]
2. Gissler M., Silverio M. M., Heminki E. In-vitro fertilisation pregnancies perinatal health in Finland 1991–1993. Hum. Reprod. 1995; 10(7): 1856–61.
3. Spandorfer S. D., Davis O. K., Barmat L. I., Chung P. H., Rosenwaks Z. Relationship between maternal age and aneuploidy in in vitro fertilization pregnancy loss. Fertil. Steril. 2004; 81(5): 1265–9.
4. Page J. M., Silver R. M. Genetic causes of recurrent pregnancy loss. Clin. Obstet. Gynecol. 2016; 59(3): 498–508.
5. Sahoo T., Dzidic N., Strecker M. N., Commander S., Travis M. K., Doherty C. et al. Comprehensive genetic analysis of pregnancy loss by chromosomal microarrays: outcomes, benefits, and challenges. Genet. Med. 2017; 19(1): 83–9.
6. Назаренко С. А., Суханова Н. Н., Лебедев И. Н., Никитина Т. В., Саженова И. А. Структура хромосомных нарушений у 552 спонтан-

- ных абортусов томской популяции. Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Новосибирск; 2005. 7: 158–65. [Nazarenko S. A., Suhanova N. N., Lebedev I. N., Nikitina T. V., Sazhenova I. A. Struktura hromosomnykh narushenij u 552 spontannykh abortusov tomskoj populjacji. Molekularno-biologicheskie tehnologii v medicinskoj praktike. Novosibirsk; 2005. 7: 158–65. (in Russian)]
7. Govaerts I., Koenig I., Van den Bergh M., Bertrand E., Revelard Ph., Englert Y. Is intracytoplasmic sperm injection (ICSI) a safe procedure? What do we learn from early pregnancy data about ICSI? Hum. Reprod. 1996; 11(2): 440–3.
 8. Martin R. H. The risk of chromosomal abnormalities following ICSI. Hum. Reprod. 1996; 10(7): 924–5.
 9. Золотухина Т. В., Витязева И. И., Здановский В. М., Шилова Н. В., Мельникова Л. Л. Комплексное обследование в семьях с неразвивающимися беременностями, наступившими в результате вспомогательных репродуктивных технологий. Методические рекомендации. 2003; 51: 17. [Zolotukhina T. V., Vityazeva I. I., Zdanovskii V. M., Shilova N. V., Mel'nikova L. L. Kompleksnoe obsledovanie v sem'yakh s nerazvivayushchimsya beremennostyami, nastupivshimi v rezul'tate vspomogatel'nykh reproduktivnykh tekhnologii. Metodicheskie rekomendatsii. 2003; 51: 17. (in Russian)]

Библиографическая ссылка:

Глинкина Ж. И., Курцер М. А., Будник И. В. Исследование хромосомной патологии в клетках неразвивающегося хориона методом высокопроизводительного секвенирования // Доктор.Ру. 2017. № 7 (136). С. 43–45.

Citation format for this article:

Glinkina Zh. I., Kurtser M. A., Budnik I. V. Next-Generation Sequencing for Evaluation of Chromosomal Abnormalities in the Cells of Non-Viable Chorionic Villi. Doctor.Ru. 2017; 7(136): 43–45.