

УДК 576.312.36+575.113:618.39.393

ІМУНОГЕНЕТИЧНІ ТА ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ КЛІТИН ВОРСИН ХОРІОНА РАНИХ ВИКИДНІВ ЛЮДИНИ

К.О. СОСНІНА, І.Р. ТКАЧ, Н.Л. ГУЛЕЮК, І.А. СЕДНЄВА, Д.В. ЗАСТАВНА

ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»

Україна, 79000, Львів, вул. Лисенка 31-а

e-mail: katja.sosnina@gmail.com

Мета. Провести імуногенетичні та цитогенетичні дослідження клітин ворсин хоріона раних викиднів людини. **Методи.** Імуногенетичні дослідження проводили за допомогою молекулярно-генетичних методів: виділення ДНК з ворсин хоріона методом фенольної екстракції, полімеразної ланцюгової реакції та розділення продуктів ПЛР у 3% агарозному гелі. Цитогенетичні дослідження проводили на метафазних пластинах, отриманих з некультивованих та короткокультивованих ворсин хоріона, які аналізували під світловим мікроскопом при збільшенні $\times 1000$. **Результати.** Провели молекулярно-генетичне дослідження поліморфізму інсерція/делеція 14 п.н. гена HLA-G на матеріалі ворсин хоріона раних викиднів людини. Встановили статистично достовірне підвищення гомозиготного генотипу за алелем інсерція у досліджуваній групі порівняно з контролем. Обрахунок відношення шансів показав, що наявність даного генотипу збільшує ризик раних репродуктивних втрат у 2,4 разу. Цитогенетичне дослідження дозволило виявити кількісні зміни хромосом у 32% випадків, серед яких переважала триплоїдія – 14,5% та трисомія по 16-й хромосомі – 6%. **Висновки.** Результати виконаних досліджень вказують на необхідність проведення комплексного імуно- та цитогенетичного обстеження матеріалу раних репродуктивних втрат.

Ключові слова: рання репродуктивні втрати, ворсини хоріона, поліморфізм інсерція/делеція 14 п.н. гена HLA-G, каріотип.

Вступ. Під час ембріонального розвитку гине приблизно половина всіх зачатъ, причому значна частина – в доімплантаційному періоді, а серед клінічно діагностованих вагітностей біля 15–20 відсотків – у першому триместрі [1, 2]. До 85% самовільних викиднів припадає на період першого триместру вагітності [3, 4]. В 60–80% випадків вони спровоковані хромосомними аномаліями (ХА) у ембріона/плода [5–12]. До 95% зачатъ з ХА елімінується до моменту встановлення вагітності [10, 13]. Серед втрачених вагітностей першого триместру найвищий відсоток ХА становлять трисомії – 50–60%, з них трисомія по 16-й хромосомі – 15–20%, поліплоїдії – 20–25%, моносомії – 10–15%, структурні аномалії – 5–6% [10, 11, 13]. Серед трисомій найчастіше зустрічаються трисомії 16, 22, 21, 15, 13, 18 хромосом у порядку спадання [13]. Єдина форма повної моносомії, яка сумісна з внутрішньоутробним та постнатальним розвитком – моносомія по статевій хромосомі Х. Серед втрачених вагітностей частота цієї гоносомної моносомії найвища і становить 10–15%.

У 45% рання втрата вагітності супроводжується материнською інтолерантністю та окреслюється поняттям «імунонепліддя». Імунний статус організму обумовлює головний комплекс гістосумісності (МНС – Major Histocompatibility

Complex), який у людини ще називається *HLA*-системою (Human Leukocyte A-system) [14]. Слід враховувати, що не всі антигени *HLA* однаковою мірою задіяні в генезі ранніх репродуктивних втрат. Особлива функція, згідно з останніми результатами, належить *HLA-G*-антигену [15]. Це неklasичний *HLA*-антиген, який, на відміну від антигенів класичних, виявляється вже на найбільш ранніх стадіях ембріогенезу людини [16, 17]. Відповідно, можна передбачити, що певні поліморфізми, знайдені в кодуючій та регуляторних частинах гена *HLA-G* та асоційовані з різною його експресією, можуть мати значення для пролонгування вагітності [18, 19]. Зокрема, допускаємо, що при репродуктивних втрахах важлива роль належить поліморфізму інсерція/делеція 14 п.н. 3'UTR гена *HLA-G*, оскільки відомо, що він безпосередньо впливає на рівень експресії гена *HLA-G* [20].

Зважаючи на високу інформативність цитогенетичних та імуногенетичних досліджень у встановленні причин ранніх репродуктивних втрат, метою нашої роботи було комплексне обстеження клітин ворсин хоріона втрачених вагітностей людини.

Матеріали і методи

Цитогенетичні дослідження виконали на матеріалі, отриманому від 153 вагітностей, порушених у першому триместрі (терміном від 4 до 13 тижнів гестаційного розвитку). Під поняттям втраченої вагітності розуміли самовільний викидень, завмирання вагітності та переривання вагітності за медичними показаннями – встановлення вад розвитку, несумісних із постнатальним життям.

Об'єктом цитогенетичних досліджень були метафазні пластини, одержані з некультивованих та короткокультивованих ворсин хоріона. Під терміном «короткокультивовані» розуміли інкубування нативних ворсин у культуральному середовищі

RPMI 1640 фірми «Gibco» до 18 год. Приготування препаратів хромосом з ворсин хоріона проводили згідно з методикою [21] з деякими модифікаціями. З метою отримання середньомітотичних хромосом одночасно з коліцином вводили бромистий етидид в концентрації 10 мкг/мл. Для обробки ворсин використовували гіпотонічний розчин (0,55% KCl і 1% розчин цитрату натрію у співвідношенні 1:3) і етанолоцтовий фіксатор. Мацерацію ворсин проводили в 40% оцтової кислоті. Препарати витримували до наступного дня в термостаті TC-80 при +65 °C та забарвлювали GTG- або CBG-методами [22], стандартно аналізували, використовуючи мікроскоп Axiostar Plus при збільшенні $\times 1000$ (окуляр $\times 10$, об'єктив $\times 100$), максимально отриману кількість метафазних пластин задовільної якості.

Матеріалом для імуногенетичного дослідження була ДНК, виділена із ворсин хоріона 188 спонтанно елімінованих ембріонів 5–12 тижнів гестації за допомогою методу фенольної екстракції. Детекцію поліморфізму інсерція/делеція 14 п.н. 3'UTR гена *HLA-G* проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) згідно з раніше описаним протоколом [23] з деякими модифікаціями. ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклері «Терцик» («ДНК-технологія», РФ). Продукти ампліфікації візуалізували шляхом проведення електрофорезу в 3% агарозному гелі, який містив бромистий етидид, та сканували на ультрафіолетовому транслюмінаторі «ECX-15.M» (VILBERLOURMAT, Франція). Результати сканування агарозних гелів знімали цифровою камерою «Gel Imager» (HELICON, Росія). Обробку зображень здійснювали на комп'ютері за допомогою програм Adobe Photoshop CS та Gel Explorer 2.0.

Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням критерію Пірсона χ^2 . Для всіх видів аналізу за критич-

ний рівень значущості для статистичних критеріїв приймався рівень $p < 0,05$. Асоціацію генотипів з ризиком репродуктивних втрат оцінювали за допомогою розрахунку коефіцієнта шансів (Odds ratio, OR) з 95% довірчим інтервалом.

Результати та обговорення

Традиційні цитогенетичні дослідження 153 зразків клітин ворсин хоріона дозволили отримати каріотип у 90 (59%) випадків: у 61 випадку (68%) було зафіксовано нормальний каріотип, у 29 (32%) виявлено кількісні зміни хромосом. Спектр та частота хромосомних порушень висвітлені у табл. 1.

Таблиця 1. Каріотип матеріалу втрачених вагітностей

Каріотип	Кількість випадків	
	абсолютні числа	відсотки
46, XN*	61	68
69, XXN*	13	14,5
47, XN*, +16	5	6
47, XN*, +18	4	4,5
47, XY, +20	2	2
47, XN*, +21	3	3
47, XN*, +22	2	2
Всього	90	100

Примітка: N* – статеві хромосома X або Y.

Як видно з представлених результатів, серед змін каріотипу переважала триплоїдія – 45%. Серед аутосомних трисомій фіксували трисомію по хромосомах 16 (17%), 18 (14%), 21 (10%), 20 та 22 (по 7%).

Аналіз зібраного анамнезу дозволив встановити розподіл патології відповідно до кількості втрачених вагітностей у жінок (рисунок). Найвищий відсоток хромосомної патології при зібраному анамнезі встановлений у матеріалі, отриманому від першої і, наразі, єдиної, втраченої вагітності, – 42%, найнижчий – при двох і більше втрачених вагітностях (18%) та у групі зі здоровими дітьми та втраченими вагітностями (19%). Це дозволяє припустити, що при навиковому невиношуванні вагітності основним фактором переривання вагітності виступає інший чинник, скоріше за все, імунологічний.

Паралельно з цитогенетичними дослідженнями виконували дослідження поліморфізму інсерція/делеція 14 п.н. 3'UTR гена *HLA-G* на матеріалі самовільно елімінованих ембріонів порівняно з контрольною групою. Отримані результати наведено у табл. 2. Розподіл генотипів у дослідній та контрольних групах відповідав рівновазі

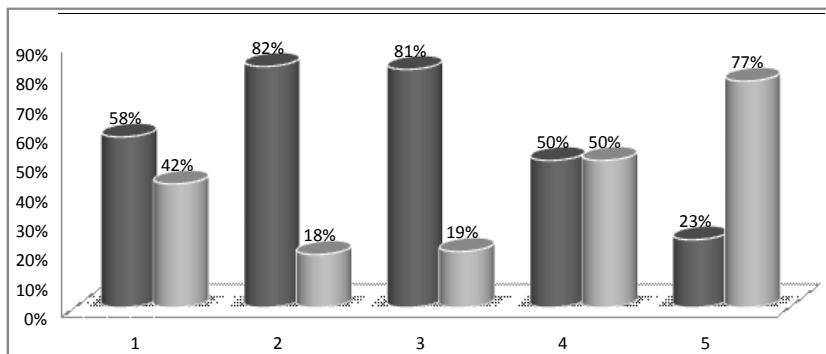


Рисунок. Результати каріотипування залежно від анамнезу обстежуваних жінок: 1 – перша втрачена вагітність, 2 – дві та більше втрачені вагітності, 3 – в анамнезі є здорові діти та втрачені вагітності, 4 – втрачені вагітності після ЕКЗ, 5 – втрачені вагітності (анамнез невідомий); ■ – 46, XN, □ – зміни каріотипу

Харді-Вайнберга ($p=1$ та $p=0,14$, відповідно). Ми проаналізували розподіл та частоту алелів за досліджуваним поліморфізмом і не встановили статистично достовірної відмінності між дослідною та контрольною групами. Аналіз генотипів поліморфізму інсерція/делеція 14 п.н. гена *HLA-G* показав, що серед досліджуваної групи з найвищою частотою зустрічався гетерозиготний генотип за даним поліморфізмом (50%). Частота гомозиготного генотипу за алелем делеція (Д) склала 23,9% і не відрізнялася від його частоти в контролі (24,1%). Гомозиготний генотип за алелем інсерція (І) зустрічався у 2 рази частіше у групі спонтанно елімінованих ембріонів у порівнянні з контрольною групою (26,1% та 13%, відповідно).

Статистичне опрацювання отриманих результатів показало вірогідне підвищення частоти гомозиготного генотипу за алелем інсерція 14 п.н. у групі спонтанно елімінованих ембріонів порівняно з контрольною групою ($\chi^2=4,048$; $p<0,05$).

Розрахунок коефіцієнта шансів (OR) з 95% довірчим інтервалом показав зростання у 2,4 рази ризику виникнення ранніх репродуктивних втрат за наявності у ембріона гомозиготного генотипу за алелем інсерція 14 п.н. (OR=2,37, CI – 95%: 1,00–5,58).

Враховуючи отримані результати щодо розподілу та частоти генотипів поліморфізму інсерція/делеція 14 п.н. 3'UTR гена *HLA-G* у матеріалі мимовільно елімінованих ембріонів, очевидно, що даний поліморфізм, безпосередньо впливаючи на експресію гена *HLA-G*, може мати значення для пролонгування вагітності.

На наступному етапі дослідження нами була відібрана група з 47 самовільно перерваних ембріонів, у яких після проведення цитогенетичного аналізу було встановлено нормальний каріотип (46, XN). За результатами молекулярно-генетичного і статис-

Таблиця 2. Аналіз розподілу поліморфізму інсерція/делеція 14 п.н. 3'UTR гена *HLA-G* у матеріалі самовільно елімінованих ембріонів

	Самовільно еліміновані ембріони (n=188)			Контроль (n=54)			χ^2	P	OR (95% CI)
	n	%	HWE (p=1)	n	%	HWE (p=0,14)			
Алелі									
Д	184	48,9		60	55,6		1,47	>0,05	0,77 (0,50–1,18)
І	192	51,1		48	44,4				1,30 (0,85–2,01)
Генотипи									
ДД	45	23,9		13	24		0,354	>0,05	0,99 (0,49–2,01)
ДІ	94	50		34	63		2,829	>0,05	0,59 (0,32–1,10)
ІІ	49	26,1		7	13		4,048	<0,05	2,37 (1,00–5,58)
Генотипи сумарно									
ДД+ДІ	139	73,9		47	87		4,05	0,04	0,42 (0,18–1,00)
ІІ	49	26,1		7	13				2,37 (1,00–5,58)

Таблиця 3. Аналіз розподілу поліморфізму інсерція/делеція 14 п.н. 3'UTR гена *HLA-G* у матеріалі самовільно елімінованих ембріонів з каріотипом 46, XN

Генотип	Втрачені вагітності, каріотип 46, XN n=47			Контроль n=54			χ^2	P	OR (95% CI)
	n	%	HWE (p=0,4)	n	%	HWE (p=0,14)			
Д/Д	12	25,5		13	24		0,029	>0,05	1,08 (0,44–2,67)
Д/І	19	40,4		34	63		5,118	<0,05	0,4 (0,18–0,89)
І/І	16	34,0		7	13		6,349		3,47 (1,28–9,39)

тичних розрахунків у даній групі показано розподіл та частоту генотипів поліморфізму інсерція/делеція 14 п.н. 3'UTR гена *HLA-G*. Результати наведені у табл. 3.

Розподіл генотипів у дослідній та контрольній групах відповідав рівновазі Харді-Вайнберга ($p=0,4$ та $p=0,14$, відповідно). Частота гомозиготного генотипу за алелем делеція 14 п.н. у дослідній та контрольній групах практично не відрізнялась і становила 25,5% та 24%, відповідно. Частота гетерозигот була вірогідно знижена у дослідній групі – 40,4% проти 63% у контролі. Статистично достовірно підвищеною була частота гомозиготного генотипу за алелем інсерція 14 п.н. (34%) порівняно з контрольною групою (13%, $p<0,05$).

Обрахунок відношення шансів (OR) показав збільшення ризику виникнення ранніх репродуктивних втрат у 3,5 разу за наявності гомозиготного генотипу за алелем інсерція 14 п.н. Порівняння значення відношення шансів, викладених у табл. 2 та 3, дозволяє висловити припущення про зростання ризику ранніх репродуктивних втрат ембріонів з нормальним каріотипом за наявності гомозиготного генотипу за алелем інсерція 14 п.н.

Враховуючи усі отримані результати, вважаємо доцільним проводити комплексне імуні- та цитогенетичне обстеження у матеріалі втрачених вагітностей від жінок з ідіопатичними ранніми втратами.

Висновки

У матеріалі мимовільно перерваних ембріонів гомозиготний генотип за алелем інсерція 14 п.н. гена *HLA-G* статистично вірогідно підвищений порівняно з контрольною групою, що збільшує ризик ранніх репродуктивних втрат у 2,4 разу. Цитогенетичне дослідження клітин ворсин хоріонів втрачених вагітностей дозволило встановити кількісні зміни хромосом у 32% випадків, серед яких переважали триплоїдія та трисомія по 16-й хромосомі (14,5% та 6%, відповідно). Ризик ранніх репродуктивних втрат ембріонів з нормальним каріотипом зростає у 3,5 разу за наявності гомозиготного генотипу за алелем інсерція 14 п.н.

Перелік літератури

1. *Экстраэмбриональные и околоплодные структуры при нормальной и осложненной беременности* / Под ред. В.Е. Радзинского. – М., 2004. – 393 с.
2. *Jaslow C.R., Carney J.L., Kutteh W.H. Diagnostic factors identified in 1020 women with two versus three or more recurrent pregnancy losses // Fertility and Sterility.* – 2010. – Vol. 93, № 4. – P. 1234–1243.
3. *Дубосарська З.М., Дука Ю.М.* Невиношування вагітності // *Здоров'я України.* – 2007. – № 9. – С. 62–68.
4. *Сукалова О.М.* Диференційований підхід до діагностики та комплексної терапії невиношування вагітності: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.01 «Акушерство та гінекологія». – К., 2002. – 66 с.

5. *Farcas S., Belebgeanu V., Popa C. et al.* Role of chromosomal translocations in recurrent spontaneous abortion // *TMJ.* – 2007. – Vol. 57, № 2–3. – P.117 – 121.
6. *Балахонов А.В.* Ошибки развития. – Ленинград: Изд-во Лен. ун-та, 1990. – 278 с.
7. *Юдина Е.В.* Трисомия 18: анализ 28 случаев пренатальной диагностики // *Пренатальная диагностика.* – 2002. – Т.1, №1. – С.35 – 42.
8. *Delhanty J., Handyside A.* The origin of genetic defect in the human and their detection in the preimplantation embryo // *Hum. Rep. Update.* – 1995. – Vol. 1. – P. 201 – 215.
9. *Goddijn M.M., Leschot N.J.* Genetic aspects of miscarriage // *Clinical Obstetrics and Gynaecology.* – 2000. – Vol. 14. – P. 855 – 865.
10. *Баранов В.С., Кузнецова Т.В.* Цитогенетика эмбрионального развития человека. – СПб.: Н-Л, 2007. – С. 170 – 209.
11. *Kim J.W., Yoon T.K. et al.* Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment // *BMC Med. Genet.* – 2010. – Vol. 11. – P.153 – 159.
12. *Franssen M.T.M., Musters A.M., van der Veen F. et al.* Reproductive outcome after PGD in couples with recurrent miscarriage carrying a structural chromosome abnormality: a systematic review // *Human Reproduction Update.* – 2011. – Vol. 17, № 4. – P. 467 – 475.
13. *Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Soloviev I.V. et al.* Original collection of DNA probes for preimplantational, fetal prenatal and postnatal diagnosis of chromosomal analysis by FISH / In *Early Prenatal Diagnosis, Fetal Cells and DNA in Mother. Present State and Perspectives.* Edited by: Macek M.Sr., Bianchi D., Cuckle H.– Prague: The Karolinum Press, 2002. – P.275 – 283.
14. *Hviid T.V., Hylenius S., Hoegh A.M. et al.* HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions // *Tissueantigens.* – 2002. – Vol. 60, № 2. – P. 122–132.
15. *Berger D.S., Hogge W.A., Barmada M.M. et al.* Comprehensive analysis of HLA-G: implications for recurrent spontaneous abortion // *Reproductive Sciences.* – 2010. – Vol. 17, № 4. – P. 331–338.
16. *Hunt J.S., Langat D.K., McIntire R.H.* The role of HLA-G in human pregnancy // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2006. – Vol. 10, № 4 – P.45–48.
17. *Hviid T.V.* HLA-G genotype is associated with fetoplacental growth // *Hum. Immunol.* – 2004. – № 65. – P. 586–593.
18. *Ober C., Chervoneva I., Billstrand C. et al.* Variation in the HLA-G Promoter Region Influences Miscarriage Rates // *J. Hum. Genet.* – 2003. – Vol. 72. – P. 1425–1435.
19. *Pfeiffer K.A., Fimmers R.* The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion // *Molecular Human Reproduction* – 2001. – Vol. 7, № 4. – P. 373–378.
20. *Aruna M., Sirisha P.V., Andal Bhaskar S. et al.* Role of 14-bp insertion/deletion polymorphism in HLA-G among Indian women with recurrent spontaneous abortions // *Tissue Antigens.* – 2011. – Vol. 77, № 2. – P.131–135.
21. *Pflueger S.M.V.* Cytogenetics of spontaneous abortions / In: *The principles of clinical cytogenetics* / Eds. Gersen S.L., Keagle M.B. – USA, Totowa: Humana press, 2005. – P. 323–345.
22. *Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П. и др.* Хромосомы человека. Атлас. – М.: Медицина, 1982. – 263 с.
23. *Moreau P., Contu L., Alba F.* HLA-G Gene Polymorphism in Human Placentas: Possible Association of G*0106 Allele with Preeclampsia and Miscarriage // *Biology of Reproduction.* – 2008. – Vol. 79, № 3. – P. 459–467.

*Представлено М.А. Пілінською
Надійшла 20.05.2013*

**ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ
И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
КЛЕТОК ВОРСИН ХОРИОНА
РАННИХ ВЫКИДЫШЕЙ ЧЕЛОВЕКА**

*К.А. Соснина, И.П. Ткач, Н.Л. Гулеюк,
И.А. Седнева, Д.В. Заставна*

ГУ «Институт наследственной патологии НАМН
Украины»
Украина, 79000, Львов, ул. Лысенко, 31-а
e-mail: katja.sosnina@gmail.com

Цель. Провести иммуногенетическое и цитогенетические исследования клеток ворсин хориона ранних репродуктивных потерь человека. **Методы.** Иммуногенетические исследования проводили с помощью молекулярно-генетических методов: выделение ДНК из ворсин хориона методом фенольной экстракции, полимеразной цепной реакции и разделения продуктов ПЦР в 3% агарозном геле. Цитогенетические исследования проводили на метафазных пластинках, полученных из некультивируемых и короткокультивированных ворсин хориона, которые анализировали под световым микроскопом при увеличении ×1000. **Результаты.** Провели молекулярно-генетическое исследование полиморфизма инсерция / деле-

ция 14 п.н. гена *HLA-G* на материале ворсин хориона ранних выкидышей человека. Выявили статистически достоверное повышение гомозиготного генотипа по аллелю инсерция в исследуемой группе по сравнению с контролем. Подсчет отношения шансов показал, что наличие данного генотипа увеличивает риск ранних репродуктивных потерь в 2,4 раза. Цитогенетическое исследование позволило выявить количественные изменения хромосом в 32% случаев, среди которых преобладала триплоидия (14,5%) и трисомия по 16-й хромосоме – 6%. **Выводы.** Результаты выполненных исследований указывают на необходимость проведения комплексного иммуно- и цитогенетического исследования материала ранних репродуктивных потерь.

Ключевые слова: ранние репродуктивные потери, ворсины хориона, полиморфизм инсерция / делеция 14 п.н. гена *HLA-G*, кариотип.

IMMUNOGENETIC AND CYTOGENETIC STUDIES IN CHORIONIC VILLI CELLS OF EARLY PREGNANCY LOSS IN HUMAN

K.O. Sosnina, I.R. Tkach, N.L. Huleyuk, I.A. Sedneva, D.V. Zastavna

SI «Institute of Hereditary Pathology of the Ukrainian National Academy of Medical Sciences»
Ukraine, 79000, Lviv, Lysenko str., 31-a,
e-mail: katja.sosnina@gmail.com

The **aim** of study was to carry immunogenetic and cytogenetic analysis of chorionic villi cells of early pregnancy loss in human. **Methods.**

Immunogenetic studies were performed using molecular genetic methods: DNA isolation from chorionic villi by phenol extraction, polymerase chain reaction and agarose gel electrophoresis. Cytogenetic studies were performed on metaphase plates obtained from uncultivated and short term cultivated chorionic villi cells, which were analyzed using a light microscope with increased $\times 1000$. **Results.** Molecular genetic studies of *HLA-G* 14 bp insertion/deletion polymorphism was performed. Significantly higher *HLA-G* 14 bp insertion/insertion genotype frequency ($\chi^2 = 4.05, < 0.05$) in group of spontaneously aborted embryos was established and risk of spontaneous abortions in homozygous *HLA-G* 14 bp insertion/insertion genotype is increased up to 2,4 times (OR = 2.4, CI – 95%: 1.00–5.58). Cytogenetic studies showed chromosomal aneuploidies in 32% of cases, which are dominated triploidy (14,5%) and trisomy for chromosome 16 – 6%. **Conclusions.** The results indicated the necessity for complex of cytogenetic and immunogenetic research in early conceptus.

Key words: early reproductive losses, chorionic villi, *HLA-G* 14 bp insertion/deletion polymorphism, karyotype.