

## Chromozomové aberace jako příčina časných reprodukčních ztrát: zhodnocení 233 případů

Natálie Friedová<sup>1,2</sup>, Romana Mihalová<sup>1</sup>, Lenka Hrčková<sup>1</sup>, Hana Kučerová<sup>1</sup>, Nikola Kaspříková<sup>3</sup>, MIMOZA Janashia<sup>1</sup>, Pavel Calda<sup>4</sup>, Antonín Šípek jr.<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN

<sup>2</sup>Interní klinika 3. LF UK a Thomayerovy nemocnice

<sup>3</sup>Ústav biofyziky a informatiky 1. LF UK

<sup>4</sup>Centrum fetální medicíny, Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK a VFN

<sup>5</sup>Oddělení lékařské genetiky, Thomayerova nemocnice

Korespondenční adresa: MUDr. Antonín Šípek jr., Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN, Albertov 4, 128 00 Praha 2, tel.: +420 224 968 198, e-mail: antonin.sipek@lf1.cuni.cz

Publikováno: 7. 6. 2019

Přijato: 8. 4. 2019

Akceptováno: 20. 5. 2019

Actual Gyn 2019, 11, 23-26

ISSN 1803-9588

© 2019, Aprofema s.r.o.

Článek lze stáhnout z [www.actualgyn.com](http://www.actualgyn.com)



Citujte tento článek jako: Friedová N, Mihalová R, Hrčková L, Kučerová H, Kaspříková N, Janashia M, Calda P, Šípek A jr. Chromozomové aberace jako příčina časných reprodukčních ztrát: zhodnocení 233 případů. Actual Gyn. 2019;11:23-26

### CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN ETIOLOGY OF EARLY REPRODUCTIVE FAILURE: ANALYSIS OF 233 CASES

#### Original article

#### Abstract

Chromosomal aberrations are common cause of early miscarriage. Possible presence of chromosomal aberration may be assessed by cytogenetic examination of the aborted fetus tissue. In our study from the Institute of Biology and Medical Genetics of the First Faculty of Medicine of Charles University and General University Hospital in Prague we analysed tissue sample from 233 early spontaneous or missed abortions. In 212 cases the cultivation process was successful. Among those – we identified 52 cases with chromosomal aberration (24,5 %). Most common aberrations were – trisomy 21, monosomy X, triploidy and trisomies of chromosomes 16 and 22. Our overall incidence of aberrations was lower – compared to similar studies. According to other indicators we suppose that this may be caused by the higher incidence of maternal cells contamination – but this phenomenon cannot be completely excluded while using classical karyotyping. We also confirmed higher incidence of chromosomal aberrations in the miscarriage cases in elder mothers and furthermore we found higher incidence of aberrations in cases from higher gestation weeks. Both trends were statistically significant.

**Key words:** spontaneous abortions, chromosomal aberrations, infertility

## Původní práce

### Abstrakt

Chromozomové aberace jsou častou příčinou časných reprodukčních ztrát. Možnou přítomnost chromozomové aberace je možné ověřit cytogenetickým vyšetřením tkáně potraceného plodu. V rámci naší studie na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze jsme analyzovali vzorek tkáně u 233 případů časných spontánních či zamlklých potratů. Ve 212 případech byla kultivace úspěšná a celkem v 52 případech (24,5 %) byla zachycena chromozomová aberace – nejčastěji trizomie chromozomu 21, monozomie chromozomu X, triploidie a trizomie chromozomů 16 a 22. Celková četnost chromozomových aberací byla v našem souboru spíše nižší oproti obdobným studiím. I s ohledem na další ukazatele předpokládáme, že by příčinou mohla být kontaminace některých vzorků mateřskými buňkami, což ale nelze u rutinního cytogenetického vyšetření předem vyloučit. Dále jsme v rámci studie potvrdili vyšší četnost chromozomových aberací v případech s vyšším věkem matky a dále pak častější zastoupení chromozomových aberací v případech potratu ve vyšších týdnech těhotenství. Tyto nálezy byly statisticky významné.

**Klíčová slova:** spontánní potraty, chromozomové aberace, infertilita

### Úvod

Z čistě matematického hlediska je lidská reprodukce poměrně neefektivní. V rámci studií bylo prokázáno, že s ohledem na veškeré možné patologické vlivy, které ovlivňují lidské embryo/plod od počátku fertilizace až do doby porodu, se živě narodí asi jen 30 % dětí ze všech oplozených vajíček (1). Opakované spontánní potraty (dle definice končí potratem alespoň tři po sobě jdoucí gravidity – a to se stejným partnerem) postihují přibližně 1-2 % žen v reprodukčním věku (2). Obecně mají časně reprodukční ztráty v prvním trimestru gravidity celou řadu příčin, mezi ty negenetické by patřily například endokrinologické či imunologické abnormality, vrozené či získané hyperkoagulační stavy či vrozené malformace dělohy (3).

Pokud jde o genetické příčiny, jsou jednoznačně nejčastější příčinou časných reprodukčních ztrát chromozomové aberace, a to zejména aberace numerické. Chromozomové aberace mohou být příčinou přibližně až poloviny časných reprodukčních ztrát, v různých studiích s různým počtem/typem vzorků tkáně potracených plodů byly abnormality chromozomů zachyceny u 20 – 70 % případů (4,5,6,7).

Základním typem cytogenetického vyšetření v této indikaci je rutinní karyotypizace kultivovaných buněk ze vzorku tkáně potraceného plodu, tedy vyšetření metafázních chromozomů barvených pomocí tzv. G-pruhování v optickém mikroskopu (4). Toto vyšetření je schopné detekovat veškeré numerické odchylky chromozomů, včetně chromozomální mozaiky, balancovaných chromozomových přestavb a také rozsáhlejších delecí a duplikací. Ovšem právě v detekci drobných delecí a duplikací je klasické vyšetření karyotypu často pro svou nízkou rozlišovací schopnost ne zcela výtěžné, proto i v této indikaci (vyšetření tkáně potraceného plodu) je dnes stále častěji prováděno vyšetření typu microarray (nejčastěji ve verzi vycházející metodicky z principu komparativní genomové hybridizace array-CGH) (8,9).

### Metodika

Předkládáme retrospektivní analýzu případů vyšetření karyotypu z tkáně u potracených plodů, které byly vyšetřeny v rámci Cytogenetické laboratoře Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (ÚBLG 1. LF UK a VFN)

v letech 2009-2014 (6 let). Případy byly vybrány z interní databáze laboratoře, zahrnuty byly všechny případy za toto období, kde byl indikací k vyšetření karyotypu zamlklý či spontánní potrat. U každého případu jsme zaznamenali úspěšnost kultivace, výsledek karyotypu (u úspěšných kultivací), věk těhotné, gestační týden při potratu a také pohlaví plodu (určené dle karyotypu). Získané výsledky byly následně statisticky vyhodnoceny v programu R (10) pomocí dvouvýběrového t-testu, Wilcoxonova dvouvýběrového testu a Fisherova testu. *P*-hodnota nižší než 0,05 byla považována za statisticky významnou.

Samotná cytogenetická vyšetření byla provedena standardním způsobem s využitím obvyklých metodik pro vyšetření karyotypu ze vzorku tkáně, k vizualizaci chromozomů bylo využito G-pruhování, další vyšetření (například QF-PCR nebo array-CGH) nejsou v této indikaci v naší laboratoři rutinně prováděna. Zhodnocení karyotypu bylo provedeno s využitím mezinárodní cytogenetické nomenklatury (11).

### Výsledky

V daném období (2009-2014) bylo v rámci Cytogenetické laboratoře ÚBLG 1. LF UK a VFN v Praze vyšetřeno celkem 233 vzorků tkáně plodu z důvodu reprodukční ztráty (zamlklé či spontánní potraty), většina případů byla odeslána z Gynekologicko-porodnické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze. Z těchto 233 vyšetření jich bylo celkem 212 úspěšných (91 %) – zakončených vydáním výsledku karyotypu, ve zbylých 21 případech (9 %) pak šlo o neúspěšnou kultivaci a vyšetření tak neposkytlo validní výsledek. Hlavním důvodem k cytogenetickému vyšetření tkáně plodu byla diagnóza zamlklého potratu, a to ve 214 případech (91,9 %), méně často pak byla vyšetřována rezidua tkáně po spontánním potratu (19 případů, 8,15 %).

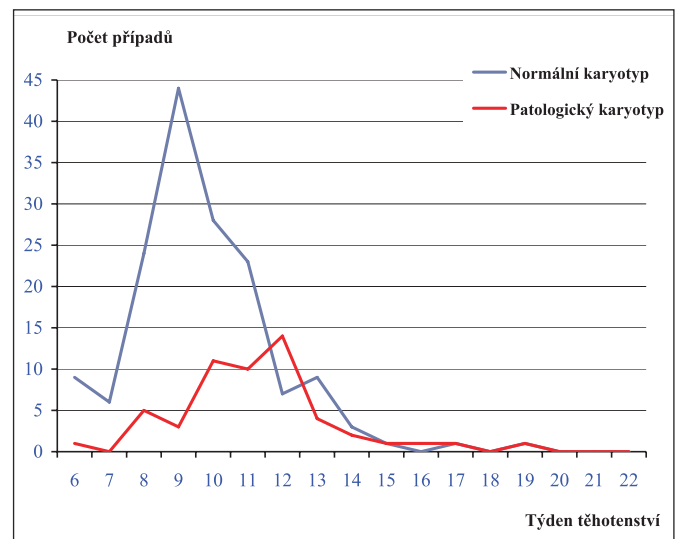
Mezi 212 úspěšnými vyšetřeními bylo zachyceno celkem 52 (24,5 %) patologických chromozomových aberací, nejčastěji byl zachycen Downův syndrom a Turnerův syndrom – obě diagnózy celkem v 7 případech, kompletní přehled dalších zachycených chromozomových aberací ukazuje **Tab. 1**.

**Tab. 1** Přehled veškerých zachycených chromozomových aberací v souboru 212 úspěšně dokončených vyšetření karyotypu z tkáně potracených plodů

Typ chromozomové aberace	Počet případů (n)	Relativní četnost (%)
Trizomie chromozomu 21	7	13,46 %
45,X	7	13,46 %
69,XXX	6	11,54 %
Trizomie chromozomu 16	6	11,54 %
Trizomie chromozomu 22	5	9,62 %
Trizomie chromozomu 9	3	5,77 %
Trizomie chromozomu 13	3	5,77 %
Trizomie chromozomu 18	2	3,85 %
Trizomie chromozomu 14	2	3,85 %
47,XY,+4	1	1,92 %
47,XX,+7	1	1,92 %
92,XXX	1	1,92 %
47,XY,+17	1	1,92 %
47,XY,+2	1	1,92 %
47,XX,+15	1	1,92 %
47,XX,+20	1	1,92 %
46,XY,der(14)	1	1,92 %
46,XX,t(4;12)(q35;q24)	1	1,92 %
46,XX,t(11;13)(q21;q21.2)	1	1,92 %
46,XX,dup(22)(q12q13)	1	1,92 %

Průměrný věk těhotných žen byl 34,06 roku ( $\pm 5,03$  SD). Nejčastěji byly vyšetřovány plody potracené ženami ve věku 35 let a více, v této skupině bylo také zaznamenáno nejvyšší procento zachycených patologických karyotypů (29,9 %). Ve skupině žen do třiceti let věku byla záchytnost chromozomových aberací o třetinu menší (20,0 %) – podrobněji jsou data shrnuta v **Tab. 2**. Závislost věku matky a výskytu numerické aberace byla vyhodnocena dvouvýběrovým t-testem a ukázala se být statisticky vý-

**Graf 1** Rozložení četnosti případů potratů v závislosti na délce gravidity (v době potratu) – rozděleno pro patologické a normální nálezy



ných vyšetření bylo celkem 169 plodů s ženským karyotypem a 43 plodů s karyotypem mužským (F/M poměr = 3,93). Zatímco ve skupině plodů s patologickým nálezem je (teoreticky rovnoměrný) poměr pohlaví bez významnější odchylky: 26 patologií u ženského karyotypu a 22 u mužského karyotypu (F/M = 1,18), ve skupině plodů s normálním karyotypem je tento trend naopak velmi výrazný: 143 případů s ženským karyotypem ku 21 případům u mužského karyotypu (F/M = 6,81). Dle Fisherova testu je také tento rozdíl pohlaví statisticky významný ( $p = 0,000003$ ), možné příčiny tohoto trendu jsou podrobně rozvedeny v diskuzi.

## Diskuze

Problematika lidské reprodukce a jejích poruch je velmi

**Tab. 2** Zastoupení chromozomových aberací v tkáni potracených plodů v různých věkových skupinách těhotných žen

Věk těhotných	Patologický karyotyp	Normální karyotyp	Celkem případů	Zastoupení patologií
29 let a méně	7	28	35	20,00 %
30-34 let	16	64	80	20,00 %
35 let a více	29	68	97	29,90 %
Celkem	52	160	212	24,53 %

znamná:  $p = 0,022$  (95% CI pro rozdíl: 0,28 až 3,50). Další sledovanou proměnnou byla délka gravidity v době, kdy došlo k potratu. Dle příslušných klinických zpráv byla průměrná délka trvání gravidity v době potratu vypočtena na 72,87 dne ( $\pm 18,75$  SD). Rozložení četnosti případů vzhledem k délce gravidity v době potratu se ovšem u patologických a normálních nálezů poměrně liší – maximum případů u patologických nálezů se vyskytuje řádově o několik dní později, nežli u nálezů normálních. Graficky je tento trend znázorněn na **Grafu 1**, statistická významnost tohoto trendu pak byla testována pomocí Wilcoxonova dvouvýběrového testu a zjištěna byla statisticky významná závislost ( $p = 0,0000041$ ).

Posledním trendem, který jsme podrobněji analyzovali, byl poměr pohlaví u vyšetřovaných plodů. Z 212 úspěš-

komplexní a složitá. Souvislost chromozomových aberací u embryí a plodů a časných reprodukčních ztrát je dlouhodobě známá. I v našem souboru bylo nalezeno významné zastoupení chromozomových abnormalit – celkem 24,5 %. Takovéto zastoupení je sice v rozmezí hodnot udávaných jinými obdobnými studii, v porovnání s průměrně udávanými přibližně 50-60 % patologických výsledků (5,6,12,13), je naše záchytnost výrazně nižší. Mezi zachycenými patologiemi jsme našli obvyklé spektrum numerických chromozomových aberací, přítomných ve tkáni potracených plodů – tedy vyšší procento Turnerova syndromu, trizomie chromozomu 16 a chromozomu 22 a dále i několik případů polyploidie (konkrétně triploidie). Nejvýznamnější autozomální trizomie – trizomie chromozomů 1 a 19 (5) nebyly v našem souboru

zachyceny. Možná překvapivě bylo zachyceno i vysoké procento trizomie chromozomu 21, což může být způsobeno skutečností, že významná část vzorků byla z tkání plodů potracených až po 11. týdnu gravidity, kdy již obecně lze více očekávat vyšší zastoupení tří „klasických“ autozomálních trizomií (tedy trizomií chromozomů 13, 18 a 21).

V našem souboru byl jednoznačně významně vychýlený poměr pohlaví u vyšetřovaných vzorků, a to konkrétně v podskupině případů s normálním karyotypem, kde byl F/M poměr dokonce 6,81. Přestože i jiné práce (5) připoustí například poměr 1:2 ve prospěch ženského pohlaví, lze takovýto statisticky významný rozdíl prohlásit za následek vyššího zastoupení maternální kontaminace, kdy se z daného vzorku tkáně podařilo vykultivovat pouze maternální buňky, které pak falešně imitují nálezy normálního ženského karyotypu. Obecně by bylo možné tomuto nežádoucímu fenoménu předcházet pomocí doplnění QF-PCR vyšetření s kontrolou maternálního profilu, pokud by bylo klinikem indikováno. Na druhou stranu bylo dosaženo velmi vysokého procenta úspěšnosti kultivace (téměř 92 %), kterou by ale v rámci podrobnější studie s vyloučením kontaminovaných vzorků bylo nutné upravit. Obecným problémem je v této situaci samozřejmě obtížná dostupnost vhodného vzorku v případech spontánního potratu.

Výtěžnost klasického vyšetření karyotypu by bylo možné rozšířit doplněním vyšetření typu microarray, které by umožnilo zachytit i další procenta chromozomálně podmíněných potratů, které však rutinní vyšetření chromozomů v optickém mikroskopu nemá šanci odhalit (8,9). Obecně lze jistě doporučit provedení microarray vyšetření zejména v případě opakovaných potratů při negativě klasického cytogenetického vyšetření, na druhou stranu by ale nemělo vyšetření typu microarray zcela nahradit rutinní karyotypizaci tkáně potraceného plodu, neboť vyšetření typu microarray nedokáže například správně identifikovat translokační formy trizomií a má rovněž obtíže při identifikaci nízkofrekvenční mozaiky, array-CGH navíc nedokáže často identifikovat triploidii (14).

V rámci naší studie se nám dále podařilo prokázat negativní vliv rostoucího věku matky na četnost chromozomálních odchylek, kdy u případů s vyšším věkem matky byly chromozomové abnormality nacházeny častěji (tento trend byl statisticky významný). To je v souladu s nálezy jiných autorů (např. 7). Dále se nám podařilo prokázat statisticky významný trend závislosti předpokládaného gestačního týdne a přítomnosti/nepřítomnosti patologie. V nižších týdnech těhotenství při potratu jsme našli významně menší zastoupení chromozomových aberací oproti vyšším týdnům.

## Závěr

Potvrdili jsme, že chromozomální aberace, detekovatelné v optickém mikroskopu, jsou významnou příčinou zamklých a spontánních potratů u člověka. Dále jsme zjistili, že i u potratů se projevuje známá závislost rostoucí četnosti chromozomových aberací se zvyšujícím se věkem těhotné ženy. Stáří gravidity u plodů, u kterých byla po potratu identifikovaná chromozomová aberace, bylo mírně vyšší, nežli u potratů, kde byl karyotyp plodů normální. Zároveň jsme ukázali, že i přes veškerou snahu je v některých případech vyšetření karyotypu plodu z dodá-

ného vzorku tkáně limitováno možností kontaminace maternální tkání, která je při použití samotné karyotypizace jen velmi obtížně odhalitelná, a výhodnější by bylo její vyloučení například pomocí metody QF-PCR. Na druhé straně, rutinní cytogenetické vyšetření je v této oblasti stále nedoceníitelné, neboť nejen v řadě případů přinese informaci pro rodiče, proč k potratu došlo, přičemž v určitých případech (translokační formy Downova syndromu, jiné strukturní aberace) může mít tato informace i důležitý přínos pro plánování další reprodukce páru.

## Literatura

- Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, et al. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril.* 1996;65(3):503-9
- Duckitt K, Qureshi A. Recurrent miscarriage. *BMJ Clin Evid.* 2011;2011:1409
- Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med.* 2013;11:154
- Carp H, Guetta E, Dorf H, Soriano D, Barkai G, Schiff E. Embryonic karyotype in recurrent miscarriage with parental karyotypic aberrations. *Fertil Steril.* 2006;85(2):446-50
- Hardy K, Hardy PJ. 1(st) trimester miscarriage: four decades of study. *Transl Pediatr.* 2015;4(2):189-200
- Jenderny J. Chromosome aberrations in a large series of spontaneous miscarriages in the German population and review of the literature. *Mol Cytogenet.* 2014;7:38
- Ljunger E, Cnattingius S, Lundin C, Annerén G. Chromosomal anomalies in first-trimester miscarriages. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005;84(11):1103-7
- Viaggi CD, Cavani S, Malacarne M, Floriddia F, Zerega G, et al. First-trimester euploid miscarriages analysed by array-CGH. *J Appl Genet.* 2013;54(3):353-9
- Li H, Liu M, Xie M, Zhang Q, Xiang J, et al. Submicroscopic chromosomal imbalances contribute to early abortion. *Mol Cytogenet.* 2018;11:41
- R Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>, 2013
- Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. *ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature.* Basel: Karger; 2013
- D'ippolito S, Di Simone N, Orteschi D, Pomponi MG, Genuardi M, Sisti LG, Castellani R, Rossi ED, Scambia G, Zollino M. The chromosome analysis of the miscarriage tissue. Miscarried embryo/fetal crown rump length (CRL) measurement: A practical use. *PLoS One.* 2017;12(6):e0178113
- Zhu X, Li J, Zhu Y, Wang W, Wu X, Yang Y, Gu L, Gu Y, Hu Y. Application of chromosomal microarray analysis in products of miscarriage. *Mol Cytogenet.* 2018;11:44
- Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM), Dugoff L, Norton ME, Kuller JA. The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;215(4):B2-9

*Práce byla podpořena grantem MZ ČR – RVO VFN64165.*