

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Сравнительная цитогенетика анэмбрионии и неразвивающейся беременности у человека

Т.В. Никитина , Е.А. Саженова, Е.Н. Толмачева, Н.Н. Суханова, С.А. Васильев, И.Н. Лебедев

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

 [t.nikitina@medgenetics.ru](mailto:t.nikitina@medgenetics.ru)

**Аннотация.** Невынашивание беременности является серьезной проблемой в репродукции человека, затрагивающей 10–15 % клинически распознаваемых беременностей. Среди случаев эмбриональной гибели можно выделить замершие (неразвивающиеся) беременности (НБ), при которых ультразвуковым признаком гибели эмбриона служит отсутствие сердцебиения, и анэмбрионии (АЭ) – отсутствие эмбриона в полости плодного мешка. Целью данного исследования было сравнение частоты хромосомных аномалий во внезародышевых тканях, выявляемых при стандартном цитогенетическом анализе материала спонтанных абортосов, в зависимости от наличия или отсутствия эмбриона. Проведено ретроспективное исследование 1551 спонтанного абортоса, проанализированного с помощью стандартного цитогенетического исследования с 1990 по 2022 г. (266 случаев АЭ и 1285 случаев НБ) в НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Выполнен сравнительный анализ частоты хромосомных аномалий и распределения частот кариотипов в зависимости от наличия эмбриона в полости плодного мешка. Статистический анализ проводили с использованием критерия хи-квадрат с уровнем значимости  $p < 0.05$ . Суммарно частота хромосомных аномалий в исследованной выборке составила 53.6 % (832/1551). Доля аномальных кариотипов в группах АЭ и НБ значимо не различалась и составила 57.1 % (152/266) и 52.9 % (680/1285) для АЭ и НБ соответственно ( $p = 0.209$ ). При НБ статистически значимо чаще встречались аномалии числа половых хромосом (6.8 % (88/1285) против 2.3 % (6/266),  $p = 0.005$ ) и триплоидии (8.9 % (114/1285) против 4.9 % (13/266),  $p = 0.031$ ). В то же время при отсутствии эмбриона статистически значимо чаще регистрировалась тетраплоидия (12.4 % (33/266) против 8.2 % (106/1285),  $p = 0.031$ ). Соотношение полов (46,XY:46,XX) среди абортосов с нормальным кариотипом составило 0.54 и 0.74 для АЭ и НБ соответственно. Таким образом, хотя частоты некоторых типов хромосомных аномалий различаются между АЭ и НБ, суммарная частота хромосомных аномалий при АЭ не повышена по сравнению с НБ, что свидетельствует о необходимости поиска причин АЭ на других уровнях организации генома, включая микроструктурные перестройки хромосом, митохондриальные мутации, нарушения импринтинга и aberrантные эпигенетические модификации.

Ключевые слова: анэмбриония; неразвивающаяся беременность; невынашивание беременности; кариотип; хромосомные аномалии; половые хромосомы; триплоидия; тетраплоидия.

**Для цитирования:** Никитина Т.В., Саженова Е.А., Толмачева Е.Н., Суханова Н.Н., Васильев С.А., Лебедев И.Н. Сравнительная цитогенетика анэмбрионии и неразвивающейся беременности у человека. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(1):28-35. DOI 10.18699/VJGB-23-05

## Comparative cytogenetics of anembryonic pregnancies and missed abortions in human

T.V. Nikitina , E.A. Sazhenova, E.N. Tolmacheva, N.N. Sukhanova, S.A. Vasilyev, I.N. Lebedev

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

 [t.nikitina@medgenetics.ru](mailto:t.nikitina@medgenetics.ru)

**Abstract.** Miscarriage is an important problem in human reproduction, affecting 10–15 % of clinically recognized pregnancies. The cases of embryonic death can be divided into missed abortion (MA), for which the ultrasound sign of the embryo death is the absence of cardiac activity, and anembryonic pregnancy (AP) without an embryo in the gestational sac. The aim of this study was to compare the frequency of chromosomal abnormalities in extraembryonic tissues detected by conventional cytogenetic analysis of spontaneous abortions depending on the presence or absence of an embryo. This is a retrospective study of 1551 spontaneous abortions analyzed using GTG-banding from 1990 to 2022 (266 cases of AP and 1285 cases of MA). A comparative analysis of the frequency of chromosomal abnormalities and the distribution of karyotype frequencies depending on the presence of an embryo in the gestational sac was carried out. Statistical analysis was performed using a chi-square test with a  $p < 0.05$  significance level. The total frequency of chromosomal abnormalities in the study was 53.6 % (832/1551). The proportion of abnormal karyotypes in the AP and MA groups did not differ significantly and amounted to 57.1 % (152/266) and 52.9 % (680/1285) for AP and MA, respectively ( $p = 0.209$ ). Sex chromosome aneuploidies and triploidies were significantly less common in the AP group than in the MA group (2.3 % (6/266) vs 6.8 % (88/1285),  $p = 0.005$  and 4.9 % (13/266) vs 8.9 % (114/1285),  $p = 0.031$ , re-

spectively). Tetraploidies were registered more frequently in AP compared to MA (12.4 % (33/266) vs. 8.2 % (106/1285),  $p=0.031$ ). The sex ratio among abortions with a normal karyotype was 0.54 and 0.74 for AP and MA, respectively. Thus, although the frequencies of some types of chromosomal pathology differ between AP and MA, the total frequency of chromosomal abnormalities in AP is not increased compared to MA, which indicates the need to search for the causes of AP at other levels of the genome organization, including microstructural chromosomal rearrangements, monogenic mutations, imprinting disorders, and epigenetic abnormalities.

Key words: anembryonic pregnancy; missed abortion; miscarriage; karyotype; chromosomal abnormalities; sex chromosomes; triploidy; tetraploidy.

**For citation:** Nikitina T.V., Sazhenova E.A., Tolmacheva E.N., Sukhanova N.N., Vasilyev S.A., Lebedev I.N. Comparative cytogenetics of anembryonic pregnancies and missed abortions in human. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(1):28-35. DOI 10.18699/VJGB-23-05

## Введение

Одна из основных проблем в репродукции человека – невынашивание беременности, в результате которого от 10 до 15 % всех клинически распознаваемых беременностей заканчиваются гибелью эмбриона или плода (Larsen et al., 2013). Цитогенетические исследования обнаруживают хромосомные аномалии в среднем у 50–60 % абортусов первого триместра беременности (Menasha et al., 2005; van den Berg et al., 2012; Hardy et al., 2016; Soler et al., 2017; Wang et al., 2020; Wu et al., 2021), также в последние годы появляется все больше данных о связи невынашивания беременности с вариациями числа копий ДНК (CNV), генными мутациями, аномалиями метилирования и другими эпигенетическими aberrациями (Levy et al., 2014; Fu et al., 2018; Fan et al., 2020; Finley et al., 2022). Установление причины гибели эмбриона помогает оценить риск при последующих беременностях, кроме того, обнаружение патологического фактора важно для психологического состояния родителей.

Одной из самых ранних форм невынашивания беременности является анэмбриония – отсутствие эмбриона в полости плодного мешка. При анэмбрионии происходит имплантация бластоцисты в стенку матки, формируется плодный мешок, однако собственно эмбрион либо не развивается изначально, либо его формирование останавливается на самых ранних стадиях (не позднее 5-й недели гестации), и далее продолжают пролиферация и рост только внезародышевых структур.

В норме приблизительно с 6-й недели беременности с помощью вагинального УЗИ в плодном мешке обнаруживаются вторичный желточный мешок и первичные зародышевые листки, а в течение 7-й недели выявляется примитивная сердечная трубка. При ранней эмбриональной гибели отмечаются следующие ультразвуковые признаки: отсутствие сердцебиения эмбриона при диаметре плодного яйца  $\geq 25$  мм, копчик-теменном размере  $\geq 7$  мм на сроке 6 недель и более; отсутствие эмбриона и его сердцебиения через 14 дней после выявления плодного яйца без желточного мешка; отсутствие эмбриона и его сердцебиения через 11 дней после выявления плодного яйца с желточным мешком (Doubilet et al., 2013). Таким образом, УЗИ позволяет дифференцировать две формы ранней эмбриональной гибели: анэмбрионию (АЭ) и неразвивающуюся беременность (НБ). Диагноз АЭ ставится при отсутствии эмбриона и желточного мешка в полости плодного яйца на сроке более 7 недель (Радзинский и др., 2015). Кроме того, ультразвуковыми критериями анэмбрионии являются плодное яйцо более 13 мм без

желточного мешка или более 18 мм без эмбриона. Отсутствие сердцебиения при наличии эмбриона служит признаком неразвивающейся беременности.

Следует иметь в виду, что в литературе существуют терминологические противоречия, которые затрудняют сравнение результатов исследований, проведенных в разных центрах. В МКБ-10 используются термины ‘blighted ovum’ и ‘missed abortion’, принятые много лет назад (Robinson, 1975), которые при современном широком применении ультразвуковой диагностики не вполне отражают клинические особенности (Farquharson et al., 2005). Специальная группа Европейского общества репродукции человека и эмбриологии (ESHRE) предложила использовать термины ‘anembryonic (empty sac) miscarriage’ для плодного яйца диаметром  $\geq 8$  мм и без желточного мешка или зародыша; ‘yolk sac miscarriage’ для плодного мешка с желточным мешком, но без зародыша; ‘embryonic miscarriage’ при КТР эмбриона более 7 мм и отсутствии сердцебиения (Kolte et al., 2015). Таким образом, диагноз АЭ включает в себя как пустой плодный мешок (empty sac), так и плодный мешок с наличием желточного мешка, но без эмбриона (yolk sac only).

Оценка частоты АЭ среди потерь беременностей первого триместра различается по данным разных авторов: от 16 % в ранних работах (Robinson, 1975), 22.6 % после ЭКО (Li et al., 2017) и до 30–40 % в большинстве исследований (Lathi et al., 2007; Cheng et al., 2014; Ouyang et al., 2016; Yoneda et al., 2018). Несмотря на распространенность АЭ, данные о частоте хромосомных аномалий при этой патологии противоречивы. Интуитивно представляется, что ранние и грубые нарушения, которые приводят к остановке развития собственно эмбриона на начальных этапах его формирования, должны быть связаны со значительно повышенной частотой и тяжестью хромосомных аномалий. Есть исследования, в которых такая зависимость обнаружена (Angiolucci et al., 2011). В то же время большинство работ, проведенных в последние годы, демонстрируют либо отсутствие значимых различий в частоте хромосомных аномалий между АЭ и НБ (Lathi et al., 2007; Muñoz et al., 2010; Ljunger et al., 2011; Liu et al., 2015), либо даже меньшую частоту аномальных кариотипов среди АЭ по сравнению с НБ (Ginsberg et al., 2001; Cheng et al., 2014; Li et al., 2017; Yoneda et al., 2018; Gu et al., 2021). Это противоречие обусловило актуальность проведения сравнительного исследования на значительной по размеру, в сравнении с опубликованными литературными данными, выборке случаев АЭ и НБ. В настоящей работе были исследованы частота и спектр хромосомных аномалий,

выявленных при стандартном цитогенетическом анализе 1551 случая эмбриональной гибели, в зависимости от наличия или отсутствия эмбриона.

## Материалы и методы

Объектом исследования был 1551 спонтанный абортус, прокаротипированный в лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Материал поступал из гинекологических клиник городов Томска и Северска. Предоставлялась информация о возрасте супругов, акушерско-гинекологическом анамнезе женщины, числе и исходе предыдущих беременностей. Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

В большинстве случаев кариотип был установлен с помощью стандартного цитогенетического исследования после культивирования экстраэмбриональных фибробластов (90.9 %, 1410 образцов) либо прямых препаратов ворсин хориона (1.9 %, 29 образцов). При невозможности провести кариотипирование применялись интерфазная FISH (флюоресцентная гибридизация *in situ*) (3.7 %, 58 образцов) и CGH (сравнительная геномная гибридизация) (3.5 %, 54 образца). С диагнозом АЭ (отсутствие эмбриона в полости плодного яйца на сроке более 7 недель, плодное яйцо более 13 мм без желточного мешка или более 18 мм без эмбриона) в лабораторию поступили 266 (17.2 %) абортусов, а 1285 абортусов (82.8 %) с наличием эмбриона были отнесены в группу НБ.

Операционный материал, обычно представлявший собой фрагменты плодного мешка, доставлялся в лабораторию в стерильном физиологическом растворе, тщательно отмывали от крови и отделяли от децидуальных тканей. Методы культивирования эмбриональных клеток, получения хромосомных препаратов, G-окраски метафазных хромосом, FISH и CGH описаны в (Лебедев, Никитина, 2013).

Статистическую значимость различий между частотами вычисляли с помощью критерия  $\chi^2$ . Проверку на нормаль-

ность распределения количественных показателей выполняли с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Вследствие выявленных отличий от нормального распределения сравнение групп проводили с применением непараметрического критерия Манна–Уитни. Отличия принимали статистически значимыми при  $p < 0.05$ . Соотношение полов (СП) вычислялось как отношение кариотипов 46,XY : 46,XX. Привычное невынашивание беременности (ПНБ) определялось как две и более потери беременности в анамнезе женщины.

Исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биобанка «Биобанк населения Северной Евразии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

## Результаты

Сравнение демографических характеристик исследованных групп абортусов приведено в табл. 1. Выборки не различались по возрасту матерей и отцов, числу беременностей и спонтанных абортусов у женщин и доле супружеских пар с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) в анамнезе женщины. Однако срок беременности (как по дате последней менструации, так и по УЗИ) в группе АЭ был значимо меньше, чем в группе НБ.

Суммарно частота хромосомных аномалий в исследованной выборке составила 53.6 % (832/1551). Частоты кариотипов по классам приведены в табл. 2. Частота хромосомных аномалий среди потерь беременности без эмбриона и беременностей с наличием эмбриональных структур составила 57.1 % (152/266) и 52.9 % (680/1285) соответственно и значимо не различалась между группами ( $p = 0.209$ ). В структуре хромосомных аномалий также не наблюдалось значимых отличий между АЭ и НБ по частоте аутомных трисомий (27.8 и 22.5 %), аутомных моносомий (1.5 и 0.6 %), структурных aberrаций (2.3 и 1.0 %) и комбинированных аномалий, включающих соче-

**Таблица 1.** Сравнение демографических показателей исследуемых групп

Показатель	Всего	АЭ	НБ	<i>p</i>
Возраст матери, лет	28.6 ± 6.23 (24.0–33.0; 28.0)	28.3 ± 6.14 (24.0–32.0; 28.0)	28.5 ± 6.18 (24.0–33.0; 28.0)	0.491
Возраст отца, лет	30.9 ± 6.69 (26.0–35.0; 30.0)	30.5 ± 6.52 (26.0–35.0; 30.0)	30.9 ± 6.64 (26.0–35.0; 30.0)	0.405
Срок беременности, недель*	9.4 ± 2.23 (8.0–11.0; 9.1)	9.0 ± 2.13 (7.5–10.1; 9.0)	9.5 ± 2.24 (8.0–11.0; 9.3)	<b>0.001</b>
Срок беременности по УЗИ, неделя	7.3 ± 1.84 (6.0–8.5; 7.0)	6.6 ± 1.62 (5.5–7.6; 6.5)	7.5 ± 1.84 (6.0–8.5; 7.3)	<b>&lt;0.001</b>
Число беременностей	2.9 ± 2.20 (1.0–4.0; 2.0)	3.2 ± 2.42 (1.0–4.5; 2.0)	2.9 ± 2.18 (1.0–4.0; 2.0)	0.085
Число спонтанных абортусов	1.6 ± 1.05 (1.0–2.0; 1.0)	1.6 ± 1.13 (1.0–2.0; 1.0)	1.6 ± 1.04 (1.0–2.0; 1.0)	0.633
ПНБ в анамнезе, %	38.7	35.5	39.4	0.278

Примечание. Для количественных показателей указаны: среднее ± стандартное отклонение, в скобках – нижний и верхний квартиль; медиана; \* срок беременности, рассчитанный по дате последней менструации; значение *p* указано для сравнения АЭ и НБ. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

**Таблица 2.** Частоты нормальных кариотипов и хромосомных аномалий, выявленных при АЭ и НБ

Кариотип	Всего <i>n</i> = 1551	АЭ <i>n</i> = 266	НБ <i>n</i> = 1285	<i>p</i>
46,XX	422 (27.2)	74 (27.8)	348 (27.1)	0.806
46,XY	297 (19.1)	40 (15.0)	257 (20.0)	0.062
Анеуплоидии по половым хромосомам	94 (6.1)	6 (2.3)	88 (6.8)	<b>0.005</b>
Трисомии аутосом	363 (23.4)	74 (27.8)	289 (22.5)	0.062
Триплоидии	127 (8.2)	13 (4.9)	114 (8.9)	<b>0.031</b>
Тетраплоидии	139 (9.0)	33 (12.4)	106 (8.2)	<b>0.031</b>
Структурные aberrации	19 (1.2)	6 (2.3)	13 (1.0)	0.094
Моносомии аутосом	12 (0.8)	4 (1.5)	8 (0.6)	0.136
Другие	11 (0.7)	3 (1.1)	8 (0.6)	0.372
Сочетанные аномалии	67 (4.3)	13 (4.9)	54 (4.2)	0.618

Примечание. В скобках указаны проценты; значение *p* указано для сравнения АЭ и НБ. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

тание различных типов хромосомных aberrаций у одного абортуса (4.9 и 4.2 %) (см. табл. 2). В то же время числовые аномалии половых хромосом при АЭ встречались втрое реже, чем при наличии эмбриона (2.3 и 6.8 %,  $p = 0.005$ ). Эта разница оказалась еще больше выражена для моносомии X: 0.8 % (2/266) и 5.0 % (64/1285),  $p < 0.001$ .

Кроме того, отсутствие эмбриона реже ассоциировалось с триплоидным, но чаще – с тетраплоидным кариотипом: 4.9 и 8.9 % ( $p = 0.031$ ); 12.4 и 8.2 % ( $p = 0.031$ ) при АЭ и НБ соответственно. Поскольку часть тетраплоидных кариотипов в мозаичной форме может представлять собой культуральные артефакты (тетраплоидизацию в культуре), были уточнены частоты для тетраплоидий, подтвержденных FISH в некультивированных тканях; при этом различия оказались даже более статистически значимыми: 14/266 (5.3 %) при АЭ против 22/1285 (1.7 %) при НБ ( $p < 0.001$ ).

Среди абортусов с нормальным кариотипом соотношение полов составило 0.54 для АЭ и 0.74 для НБ. Значимых отличий в распределении кариотипов 46,XX и 46,XY не выявлено ( $p = 0.142$ ).

## Обсуждение

Целью нашей работы была сравнительная оценка частоты хромосомных аномалий при потерях беременности с отсутствием эмбриона (АЭ) и с его наличием (НБ). Мы обследовали значительную по размеру (1551 абортус) выборку случаев ранней эмбриональной гибели и не обнаружили значимых отличий по частоте хромосомных аномалий между этими двумя группами (57.1 и 52.9 % соответственно,  $p = 0.209$ ). Анализ ранее опубликованных сравнительных исследований показал, что относительно корреляции между наличием эмбриона в полости плодного мешка и кариотипом получены противоречивые результаты (табл. 3).

Частота аномальных кариотипов положительно коррелировала с диагнозом АЭ по данным (Angiolucci et al., 2011), однако эта корреляция вычислялась авторами относительно погибших эмбрионов с нормальными УЗИ-признаками. Мы пересчитали ее, сравнив АЭ с остальными

группами абортусов (с наличием эмбриона), и не обнаружили статистически достоверной зависимости частоты хромосомных аномалий от наличия/отсутствия эмбриона ( $p = 0.381$ ) (см. табл. 3). В ряде публикаций (Lathi et al., 2007; Muñoz et al., 2010; Ljunger et al., 2011; Liu et al., 2015) ассоциации частоты аномальных кариотипов с наличием/отсутствием эмбриона не выявлено, как и в настоящей работе. Однако в большинстве исследований, проведенных в последние годы на относительно больших выборках, обнаружена отрицательная корреляция между отсутствием эмбриона и хромосомными aberrациями (Cheng et al., 2014; Li et al., 2017; Yoneda et al., 2018; Gu et al., 2021). Это расхождение может быть связано с различиями в методах установления кариотипа, размерах выборок и структуре популяций (см. табл. 3). Кроме того, некоторые исследования проведены на смещенных выборках: например, охватывают женщин с бесплодием (Li et al., 2017) или из групп высокого риска по анеуплоидиям (Muñoz et al., 2010), или средний возраст матерей в выборке был более 35 лет (Ginsberg et al., 2001; Muñoz et al., 2010; Angiolucci et al., 2011). Тем не менее результаты анализа совокупности имеющихся в литературе данных начиная с 2001 г., поскольку в более ранних работах обследованы небольшие выборки, свидетельствуют о том, что при АЭ частота хромосомных аномалий ниже, чем при замершей беременности с эмбрионом: 44.4 % (813/1833) против 59.3 % (2701/4558) соответственно,  $p < 0.001$  (см. табл. 3). Сходные выводы были сделаны также по результатам метаанализа ( $p = 0.03$ , OR = 0.68, 95 % CI = 0.48–0.97) (Huang et al., 2019).

Возможным объяснением данного феномена может быть то, что на разных стадиях раннего эмбрионального развития критичны различные типы генетических нарушений. Косвенным подтверждением этого предположения является различие в частоте хромосомных аномалий для двух отличающихся патологических фенотипов, входящих в диагноз «анэмбриония»: пустой плодный мешок (empty sac) и плодный мешок с наличием желточного мешка, но без эмбриона (yolk sac only). Так, в работах (Ouyang et al., 2016; Li et al., 2017; Gu et al., 2021) в группе АЭ с пустым

**Таблица 3.** Частоты хромосомных аномалий при АЭ и НБ в различных исследованиях

Литературный источник	N	Метод	Частота хромосомных аномалий		p
			при АЭ	при НБ	
Настоящая работа	1551	Культуры, G-banding	57.1 % (152/266)	52.9 % (680/1285)	0.209
Романова, 2022	273	ППВХ, Q-banding	25.7 % (9/35)	67.2 % (160/238)	<0.050
Gu et al., 2021	1102 (887)	ХМА	47.1 % (64/136)	62.1 % (466/751)	0.001
Yoneda et al., 2018	151 (141)	Культуры, G-banding	50.8 % (32/53)	77.3 % (68/88)	<0.001
Li et al., 2017	2172 после ЭКО	CGH + FISH	28.1 % (138/491)	52.2 % (641/1227)	<0.001
			43.4 % (197/454)		0.002
			35.4 % (335/945)		<0.001
			суммарно АЭ		
Liu et al., 2015	183	Культуры, G-banding	56.1 % (32/57)	61.1 % (77/126)	0.526
Cheng et al., 2014	223	Культуры, G-banding	46.3 % (37/80)	61.5 % (88/143)	0.030
Angiolucci et al., 2011	156	G-banding	72.2 % (13/18)	33.8 % (23/68)*	0.006
				61.6 % (85/138)**	0.381
Ljunger et al., 2011	259 (239)	ППВХ, G-banding	54.5 % (48/88)	65.6 % (99/151)	0.092
Muñoz et al., 2010	185	ППВХ, G-banding	60.5 % (26/43)	67.6 % (96/142)	0.387
Lathi et al., 2007	272	Культуры, G-banding	58.2 % (53/91)	68.0 % (123/181)	>0.050
Ginsberg et al., 2001	129	G-banding	57.1 % (12/21)	90.7 % (98/108)	<0.001
Vcero	6411	–	44.4 % (813/1833)	59.3 % (2701/4558)	<0.001

Примечание. N – объем выборки, в скобках указано число случаев, для которых проведено сравнение АЭ и НБ. G-banding – стандартное кариотипирование; ППВХ – прямые препараты ворсин хориона; ХМА – хромосомный микроматричный анализ; CGH – сравнительная геномная гибридизация; FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*.

\* Относительно абортусов с нормальным фенотипом по УЗИ; \*\* относительно абортусов с наличием эмбриона по УЗИ.

плодным мешком частота хромосомных аномалий была статистически значимо ниже, чем в группе АЭ с наличием только желточного мешка (см. табл. 3).

Наличие желточного мешка в плодном яйце без эмбриона означает, что имеющиеся нарушения проявляются после обособления гипобласта и эпибласта, происходящего на 6–7-й день после оплодотворения. Гипобласт, дающий начало энтодерме желточного мешка, продолжает развитие, тогда как клетки эпибласта, дающие начало трем зародышевым листкам (энтодерме, эктодерме и мезодерме), составляющим ткани собственно эмбриона, блокируются. Пустой плодный мешок означает, что нарушения проявились до разделения внутренней клеточной массы на гипобласт и эпибласт, т. е. во время имплантации (Boss et al., 2018). На такой ранней стадии влияние негенетических факторов вряд ли может быть существенным. Сниженная частота хромосомных аномалий у этих зародышей может быть объяснена тем, что на столь ранних этапах развития критичны не столько изменение дозы генов вследствие анеуплоидии, сколько, например, точковые мутации, CNV или эпигенетические аномалии, нарушающие активность генов, важных в раннем эмбриогенезе.

Учитывая тот факт, что отсутствие эмбриона в полости плодного мешка не связано с повышенной частотой выявляемых хромосомных аномалий, и то, что чем раньше происходит прекращение развития собственно эмбриона, тем больший вклад в этот феномен вносят генетические, а не материнские или средовые факторы, перспективным представляется поиск в материале АЭ эпигенетических аномалий и генетических нарушений субхромосомного уровня (Лебедев и др., 2013). Так, с помощью микроматричного анализа было выявлено большее число вариаций числа копий ДНК (CNV) при АЭ, чем при НБ (299 и 132 соответственно), причем при АЭ обнаружено 54.3 % патогенетически значимых делеций и 45.7 % дупликаций, а при НБ – только дупликации (Савченко и др., 2018). Интересно, что отличался и спектр входящих в CNV генов: при АЭ чаще затрагивались гены, отвечающие за базовые биологические процессы (миграция, клеточные контакты, адгезия), тогда как при НБ – гены, отвечающие за морфогенез.

Мы обнаружили различия в частотах различных типов хромосомных аномалий между абортусами с наличием и отсутствием эмбриона. В нашей выборке анеуплоидии

по половым хромосомам (в особенности кариотип 45,X) реже встречались при АЭ, чем при НБ (см. табл. 2). Статистически значимо более высокая частота кариотипа 45,X обнаружена при замерших беременностях с наличием эмбриона и в большинстве опубликованных сравнительных исследований (Minelli et al., 1993; Muñoz et al., 2010; Cheng et al., 2014; Веропотвелян, Кодунов, 2015; Liu et al., 2015; Li et al., 2017; Ozawa et al., 2019; Gu et al., 2021). Эти результаты показывают, что моносомия X не оказывает заметного негативного влияния на ранний рост собственно эмбриона, и такие зародыши погибают на более поздних этапах, возможно, вследствие недостатка функции трофобласта (Ahern et al., 2022).

Другой тип аномалий, чаще встречающийся при наличии эмбриона, – триплоидии. Предполагается, что триплоидии в основном возникают в результате ошибок оплодотворения, приводящих либо к диандрии (наличию двух отцовских наборов хромосом), либо к дигинии (наличию двух материнских наборов) (Thaker, 2005). Вследствие явления хромосомного импринтинга хромосомы, полученные от отца, способствуют пролиферации преимущественно тканей трофобласта. Возможно, именно диандрические триплоидии приводят к фенотипу АЭ, однако это предположение нуждается в проверке.

Общим для двух рассматриваемых типов хромосомных аномалий является то, что механизм их возникновения не связан с мейотическим нерасхождением в ооцитах. Случаи моносомии X-хромосомы чаще всего вызваны ошибками в мейозе отца, а не матери (Hassold et al., 1988; Segawa et al., 2017), а триплоидии – ошибками оплодотворения. Поэтому среди абортусов от молодых матерей удельный вес этих типов аномалий кариотипа повышен (Soler et al., 2017; Wang et al., 2020; Gu et al., 2021). Тот факт, что в наших выборках АЭ и НБ возраст матерей не различался, подтверждает, что более высокая частота встречаемости при НБ отражает лучшую выживаемость эмбрионов с моносомией X и триплоидией.

Выявленная нами повышенная частота тетраплоидий при АЭ согласуется с данными (Веропотвелян, Кодунов, 2015; Ozawa et al., 2019) и свидетельствует о критическом влиянии тетраплоидного кариотипа, приводящем к более раннему прекращению развития эмбриона.

Мы обнаружили, что СП среди абортусов с нормальным кариотипом отклоняется от нормального и составляет 0.54 для АЭ и 0.74 для НБ. Несмотря на то что различия между группами не достигали статистически достоверного уровня ( $p = 0.142$ ), они согласуются с данными, полученными ранее в нашей лаборатории, хотя и на значительно меньших выборках. В работе (Евдокимова и др., 2000) было показано, что доля эмбрионов с кариотипом 46,XY снижалась с ростом тяжести нарушения развития: СП составляло 0.77 для самопроизвольных абортусов с хорошо развитыми эмбрионами без существенной внутриутробной задержки развития, 0.60 для НБ и 0.31 для АЭ (по сравнению со значением 1.10 у контрольной группы медицинских абортусов). Одной из причин смещенного СП может быть контаминация культур клетками материнского происхождения (материнская контаминация). Но так как обе наши выборки (АЭ и НБ) анализировались параллельно и частота материнской контаминации невы-

сока (Nikitina et al., 2005), это нивелирует ее возможное влияние на СП в данной работе. В недавно опубликованном масштабном исследовании соотношения полов в раннем онтогенезе у человека (от зачатия до рождения) было показано, что СП уменьшается примерно в первую неделю после зачатия (из-за избыточной смертности эмбрионов мужского пола), а затем увеличивается в течение как минимум 10–15 недель (из-за избыточной смертности эмбрионов женского пола) (Orzack et al., 2015). Таким образом, избыток погибших эмбрионов женского пола в первом триместре беременности, вероятно, отражает реально существующий феномен.

Развитие клеточных технологий предлагает уникальную возможность для изучения биологических механизмов, приводящих к нарушению эмбриогенеза. Так, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) воспроизводят характеристики эмбриональных стволовых клеток, включая неограниченную пролиферативную способность и плюрипотентность, т. е. способность к дифференцировке в производные трех зародышевых листков. Показано, что ИПСК можно получить в том числе из тканей трофобласта не только от эмбрионов с нормальным кариотипом, но и с некоторыми хромосомными анеуплоидиями (например, моносомия X и трисомия 13) (Parveen et al., 2017; Long et al., 2020). Если удастся репрограммировать клетки трофобласта от случаев анэмбрионии и получить линии ИПСК, это откроет возможность изучения процессов, происходящих в производных различных зародышевых листков и приводящих к ранней остановке развития собственно эмбриона.

## Заключение

Мы обнаружили, что структура хромосомных аномалий отличается между АЭ и НБ и наличие эмбриона положительно ассоциировано с анеуплоидиями по половым хромосомам и триплоидиям, а отсутствие эмбриона – с тетраплоидиями. В то же время суммарная частота хромосомных аномалий при АЭ и НБ не различалась, что свидетельствует о необходимости поиска причин АЭ на других уровнях организации генома, включая микроструктурные перестройки хромосом, моногенные мутации, нарушения импринтинга и другие aberrантные эпигенетические модификации генома.

## Список литературы / References

- Веропотвелян Н.П., Кодунов Л.О. Особенности соотношения хромосомных аномалий и терминов персистенции плодного яйца среди неразвивающихся беременностей в случаях анэмбрионии и при наличии эмбриона (анализ 1328 случаев). *Здоровье женщины*. 2015;5(101):74–80. DOI 10.15574/HW.2015.101.74.  
[Veropotvelyan N.P., Kodunov L.O. The features ratio of chromosomal abnormalities and terms of persistence of gestational sacs among undeveloping pregnancies in cases without embryo (anembryonia) and with the existing embryo: analysis of 1328 cases. *Zdorov'e Zhenshchiny = Health of Woman*. 2015;5(101):74–80. DOI 10.15574/HW.2015.101.74. (in Russian)]
- Евдокимова В.Н., Никитина Т.В., Лебедев И.Н., Суханова Н.Н., Назаренко С.А. К вопросу о соотношении полов при ранней эмбриональной летальности у человека. *Онтогенез*. 2000;31(4): 251–257.  
[Evdokimova V.N., Nikitina T.V., Lebedev I.N., Sukhanova N.N., Nazarenko S.A. About the sex ratio in connection with early embryo-

- nic mortality in man. *Russ. J. Developmental Biology*. 2000;31(4): 251-257.]
- Лебедев И.Н., Кашеварова А.А., Скрябин Н.А., Никитина Т.В., Лопаткина М.Е., Мельников А.А., Саженова Е.А., Иванова Т.В., Евтушенко И.Д. Матричная сравнительная геномная гибридизация (аггау-СГН) в диагностике хромосомного дисбаланса и CNV-полиморфизма при анэмбрионии. *Журн. акушерства и женских болезней*. 2013;62(2):117-125.
- [Lebedev I.N., Kashevarova A.A., Skryabin N.A., Nikitina T.V., Lopatkina M.E., Melnikov A.A., Sazhenova E.A., Ivanova T.V., Evtushenko I.D. Array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) in analysis of chromosomal aberrations and CNV in blighted ovum pregnancies. *Zhurnal Akusherstva i Zhenskikh Bolezney = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2013;62(2): 117-125. (in Russian)]
- Лебедев И.Н., Никитина Т.В. Цитогенетика нарушений эмбрионального развития человека (Наследственность и здоровье). Томск: Печатная мануфактура, 2013.
- [Lebedev I.N., Nikitina T.V. Cytogenetics of Human Embryonic Development Disorders (Heredity and Health). Tomsk: Pechatnaya Manufaktura Publ., 2013. (in Russian)]
- Радзинский В.Е., Маклецова С.А., Алеев И.А., Руднева О.Д., Рябинкина Т.С. Неразвивающаяся беременность. Методические рекомендации МАРС (Междисциплинарной ассоциации специалистов репродуктивной медицины). М.: Редакция журнала StatusPraesens, 2015.
- [Radzinsky V.E., Makletsova S.A., Aleev I.A., Rudneva O.D., Ryabinkina T.S. Missed miscarriage. Guidelines by MARS Reproductive Health Professional Medical Association. Moscow: StatusPraesens Editorial Office, 2015. (in Russian)]
- Романова О.А. Особенности иммунореактивности эндометрия при неразвивающейся беременности, ассоциированной с хромосомными аномалиями хорiona: Дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2022.
- [Romanova O.A. Endometrium immunoreactivity in missed miscarriage associated with chromosome aberrations in the chorion. Cand. Med. Sci. Diss. St. Petersburg, 2022. (in Russian)]
- Савченко Р.Р., Кашеварова А.А., Скрябин Н.А., Жигалина Д.И., Лопаткина М.Е., Никитина Т.В., Васильев С.А., Лебедев И.Н. Анализ CNVs при анэмбрионии и неразвивающейся беременности. *Мед. генетика*. 2018;17(3):49-54. DOI 10.25557/2073-7998.2018.03.49-54.
- [Savchenko R.R., Kashevarova A.A., Skryabin N.A., Zhigalina D.I., Lopatkina M.E., Nikitina T.V., Vasiliev S.A., Lebedev I.N. Analysis of CNVs in anembryonic pregnancy and missed abortions. *Meditsinskaya Genetika = Medical Genetics*. 2018;17(3):49-54. DOI 10.25557/2073-7998.2018.03.49-54. (in Russian)]
- Ahern D.T., Bansal P., Faustino I., Kondaveeti Y., Glat-Deeley H.R., Banda E.C., Pinter S.F. Monosomy X in isogenic human iPSC-derived trophoblast model impacts expression modules preserved in human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2022;119(40): e2211073119. DOI 10.1073/pnas.2211073119.
- Angiolucci M., Murru R., Melis G., Carcassi C., Mais V. Association between different morphological types and abnormal karyotypes in early pregnancy loss. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2011;37(2):219-225. DOI 10.1002/uog.7681.
- Boss A.L., Chamley L.W., James J.L. Placental formation in early pregnancy: how is the centre of the placenta made? *Hum. Reprod. Update*. 2018;24(6):750-760. DOI 10.1093/humupd/dmy030.
- Cheng H.H., Ou C.Y., Tsai C.C., Chang S.D., Hsiao P.Y., Lan K.C., Hsu T.Y. Chromosome distribution of early miscarriages with present or absent embryos: female predominance. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2014;31(8):1059-1064. DOI 10.1007/s10815-014-0261-9.
- Doubilet P.M., Benson C.B., Bourne T., Blaivas M., Society of Radiologists in Ultrasound Multispecialty Panel on Early First Trimester Diagnosis of Miscarriage and Exclusion of a Viable Intrauterine Pregnancy, Barnhart K.T., Benacerraf B.R., Brown D.L., Filly R.A., Fox J.C., Goldstein S.R., Kendall J.L., Lyons E.A., Porter M.B., Pretorius D.H., Timor-Tritsch I.E. Diagnostic criteria for nonviable pregnancy early in the first trimester. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(15): 1443-1451. DOI 10.1056/NEJMra1302417.
- Fan L., Wu J., Wu Y., Shi X., Xin X., Li S., Zeng W., Deng D., Feng L., Chen S., Xiao J. Analysis of chromosomal copy number in first-trimester pregnancy loss using next-generation sequencing. *Front. Genet.* 2020;11:545856. DOI 10.3389/fgene.2020.545856.
- Farquharson R.G., Jauniaux E., Exalto N., ESHRE Special Interest Group for Early Pregnancy (SIGEP). Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events. *Hum. Reprod.* 2005;20(11):3008-3011. DOI 10.1093/humrep/dei167.
- Finley J., Hay S., Oldziej J., Meredith M.M., Dzidic N., Slim R., Aradhya S., Hovanes K., Sahoo T. The genomic basis of sporadic and recurrent pregnancy loss: a comprehensive in-depth analysis of 24,900 miscarriages. *Reprod. Biomed. Online*. 2022;45(1):125-134. DOI 10.1016/j.rbmo.2022.03.014.
- Fu M., Mu S., Wen C., Jiang S., Li L., Meng Y., Peng H. Whole exome sequencing analysis of products of conception identifies novel mutations associated with missed abortion. *Mol. Med. Rep.* 2018;18(2): 2027-2032. DOI 10.3892/mmr.2018.9201.
- Ginsberg N.A., Strom C., Verlinsky Y. Crown-rump lengths in missed miscarriages and trisomy 21. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2001; 18(5):488-490. DOI 10.1046/j.0960-7692.2001.00571.x.
- Gu C., Li K., Li R., Li L., Li X., Dai X., He Y. Chromosomal aneuploidy associated with clinical characteristics of pregnancy loss. *Front. Genet.* 2021;12:667697. DOI 10.3389/fgene.2021.667697.
- Hardy K., Hardy P.J., Jacobs P.A., Lewallen K., Hassold T.J. Temporal changes in chromosome abnormalities in human spontaneous abortions: results of 40 years of analysis. *Am. J. Med. Genet. A*. 2016; 170(10):2671-2680. DOI 10.1002/ajmg.a.37795.
- Hassold T., Benham F., Leppert M. Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. *Am. J. Hum. Genet.* 1988;42(4): 534-541.
- Huang J., Zhu W., Tang J., Saravelos S.H., Poon L.C.Y., Li T.C. Do specific ultrasonography features identified at the time of early pregnancy loss predict fetal chromosomal abnormality? – A systematic review and meta-analysis. *Genes Dis.* 2019;6(2):129-137. DOI 10.1016/j.gendis.2018.10.001.
- Kolte A.M., Bernardi L.A., Christiansen O.B., Quenby S., Farquharson R.G., Goddijn M., Stephenson M.D. ESHRE Special Interest Group, Early Pregnancy. Terminology for pregnancy loss prior to viability: a consensus statement from the ESHRE early pregnancy special interest group. *Hum. Reprod.* 2015;30(3):495-498. DOI 10.1093/humrep/deu299.
- Larsen E.C., Christiansen O.B., Kolte A.M., Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med.* 2013;11:154. DOI 10.1186/1741-7015-11-154.
- Lathi R.B., Mark S.D., Westphal L.M., Milki A.A. Cytogenetic testing of anembryonic pregnancies compared to embryonic missed abortions. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2007;24(11):521-524. DOI 10.1007/s10815-007-9166-1.
- Levy B., Sigurjonsson S., Pettersen B., Maisenbacher M.K., Hall M.P., Demko Z., Lathi R.B., Tao R., Aggarwal V., Rabinowitz M. Genomic imbalance in products of conception: single-nucleotide polymorphism chromosomal microarray analysis. *Obstet. Gynecol.* 2014;124(2 Pt.1):202-209. DOI 10.1097/aog.0000000000000325.
- Li X., Ouyang Y., Yi Y., Tan Y., Lu G. Correlation analysis between ultrasound findings and abnormal karyotypes in the embryos from early pregnancy loss after in vitro fertilization-embryo transfer. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2017;34(1):43-50. DOI 10.1007/s10815-016-0821-2.
- Liu Y., Liu Y., Chen H., Du T., Tan J., Zhang J. The frequencies of the presence of embryonic pole and cardiac activity in early miscarriages with abnormal karyotypes. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 2015; 42(4):490-494.
- Ljunger E., Stavreus-Evers A., Cnattingius S., Ekbohm A., Lundin C., Annéren G., Sundström-Poromaa I. Ultrasonographic findings in spontaneous miscarriage: relation to euploidy and aneuploidy. *Fertil. Steril.* 2011;95(1):221-224. DOI 10.1016/j.fertnstert.2010.06.018.

- Long P., Liu Z., Wu B., Chen J., Sun C., Wang F., Huang Y., Chen H., Li Q., Ma Y. Generation of an induced pluripotent stem cell line from chorionic villi of a Patau syndrome spontaneous abortion. *Stem Cell Res.* 2020;45:101789. DOI 10.1016/j.scr.2020.101789.
- Menasha J., Levy B., Hirschhorn K., Kardon N.B. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study. *Genet. Med.* 2005;7(4):251-263. DOI 10.1097/01.gim.0000160075.96707.04.
- Minelli E., Buchi C., Granata P., Meroni E., Righi R., Portentosio P., Giudici A., Ercoli A., Sartor M.G., Rossi A. Cytogenetic findings in echographically defined blighted ovum abortions. *Ann. Genet.* 1993;36(2):107-110.
- Muñoz M., Arigita M., Bennasar M., Soler A., Sanchez A., Borrell A. Chromosomal anomaly spectrum in early pregnancy loss in relation to presence or absence of an embryonic pole. *Fertil. Steril.* 2010;94(7):2564-2568. DOI 10.1016/j.fertnstert.2010.04.011.
- Nikitina T.V., Lebedev I.N., Sukhanova N.N., Sazhenova E.A., Nazarenko S.A. A mathematical model for evaluation of maternal cell contamination in cultured cells from spontaneous abortions: significance for cytogenetic analysis of prenatal selection factors. *Fertil. Steril.* 2005;83(4):964-972. DOI 10.1016/j.fertnstert.2004.12.009.
- Orzack S.H., Stubblefield J.W., Akmaev V.R., Colls P., Munné S., Scholl T., Steinsaltz D., Zuckerman J.E. The human sex ratio from conception to birth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015;112(16):E2102-E2111. DOI 10.1073/pnas.1416546112.
- Ouyang Y., Tan Y., Yi Y., Gong F., Lin G., Li X., Lu G. Correlation between chromosomal distribution and embryonic findings on ultrasound in early pregnancy loss after IVF-embryo transfer. *Hum. Reprod.* 2016;31(10):2212-2218. DOI 10.1093/humrep/dew201.
- Ozawa N., Ogawa K., Sasaki A., Mitsui M., Wada S., Sago H. Maternal age, history of miscarriage, and embryonic/fetal size are associated with cytogenetic results of spontaneous early miscarriages. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019;36(4):749-757. DOI 10.1007/s10815-019-01415-y.
- Parveen S., Panicker M.M., Gupta P.K. Generation of an induced pluripotent stem cell line from chorionic villi of a Turner syndrome spontaneous abortion. *Stem Cell Res.* 2017;19:12-16. DOI 10.1016/j.scr.2016.12.016.
- Robinson H.P. The diagnosis of early pregnancy failure by sonar. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1975;82(11):849-857. DOI 10.1111/j.1471-0528.1975.tb00588.x.
- Segawa T., Kuroda T., Kato K., Kuroda M., Omi K., Miyauchi O., Watanabe Y., Okubo T., Osada H., Teramoto S. Cytogenetic analysis of the retained products of conception after missed abortion following blastocyst transfer: a retrospective, large-scale, single-centre study. *Reprod. Biomed. Online.* 2017;34(2):203-210. DOI 10.1016/j.rbmo.2016.11.005.
- Soler A., Morales C., Mademont-Soler I., Margarit E., Borrell A., Borro V., Muñoz M., Sánchez A. Overview of chromosome abnormalities in first trimester miscarriages: a series of 1,011 consecutive chorionic villi sample karyotypes. *Cytogenet. Genome Res.* 2017;152(2):81-89. DOI 10.1159/000477707.
- Thaker H.M. The partly molar pregnancy that is not a partial mole. *Pediatr. Dev. Pathol.* 2005;8(2):146-147. DOI 10.1007/s10024-005-2164-3.
- van den Berg M.M., van Maarle M.C., van Wely M., Goddijn M. Genetics of early miscarriage. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1822(12):1951-1959. DOI 10.1016/j.bbdis.2012.07.001.
- Wang H., Yuan D., Wang S., Luo L., Zhang Y., Ye J., Zhu K. Cytogenetic and genetic investigation of miscarriage cases in Eastern China. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2020;33(20):3385-3390. DOI 10.1080/14767058.2019.1572738.
- Wu X., Su L., Xie X., He D., Chen X., Wang M., Wang L., Zheng L., Xu L. Comprehensive analysis of early pregnancy loss based on cytogenetic findings from a tertiary referral center. *Mol. Cytogenet.* 2021;14(1):56. DOI 10.1186/s13039-021-00577-8.
- Yoneda S., Shiozaki A., Yoneda N., Sameshima A., Ito M., Shima T., Nakashima A., Yoshino O., Kigawa M., Takamori R., Shinagawa Y., Saito S. A yolk sac larger than 5 mm suggests an abnormal fetal karyotype, whereas an absent embryo indicates a normal fetal karyotype. *J. Ultrasound Med.* 2018;37(5):1233-1241. DOI 10.1002/jum.14467.

#### ORCID ID

T.V. Nikitina orcid.org/0000-0002-4230-6855  
E.A. Sazhenova orcid.org/0000-0003-3875-3932  
E.N. Tolmacheva orcid.org/0000-0002-0716-4302  
S.A. Vasilyev orcid.org/0000-0002-5301-070X  
I.N. Lebedev orcid.org/0000-0002-0482-8046

**Благодарности.** Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания, № 122020300041-7.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.09.2022. После доработки 14.11.2022. Принята к публикации 18.11.2022.