

Ocena kariotypu ciężarnej z zagrażającym poronieniem

Rating karyotype pregnant with threatening miscarriage

Aneta Sulej¹, Magdalena Sulima², Magdalena Lewicka², Szymon Zmorzyński³

¹ Studentka kierunku Położnictwo, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska – projekt „MEDFUTURE – medyczne zawody przyszłości”

² Zakład Położnictwa, Ginekologii i Pielęgniarstwa Położniczo-Ginekologicznego, Wydział Nauk o Zdrowiu. Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

³ Katedra Genetyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

European Journal of Medical Technologies
2015; 4(9): 61-67

Copyright © 2015 by ISASDMT
All rights reserved
www.medical-technologies.eu
Published online 24.12.2015

Adres do korespondencji:

dr n. o zdr. Magdalena Sulima
Zakład Położnictwa, Ginekologii i Pielęgniarstwa Położniczo-Ginekologicznego, Wydział Pielęgniarstwa i Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 6
20-093 Lublin
e-mail: magdalena.sulima@umlub.pl

Streszczenie

Poronienie jest to zakończenie ciąży przed końcem 22. tygodnia jej trwania, przyjmując za kryterium masę ciała płodu, poronienie można definiować również jako wydalenie z jamy macicy jaja płodowego o wadze mniejszej niż 500 g. W Polsce do straty ciąży w wyniku poronienia dochodzi rocznie w ponad 40 tysiącach przypadków, co stanowi około 10-20% rozpoznanych klinicznie ciąż. W etiopatogenezie poronień samoistnych dominującą rolę odgrywają czynniki genetyczne. Głównym warunkiem prowadzącym do powstania zaburzeń o podłożu genetycznym jest nieprawidłowa liczba lub struktura chromosomów. Dwa lub więcej poronień samoistne w I trymestrze ciąży są wskazaniem do badania kariotypu celem analizy przypadku i określenia, czy poronienie jest spowodowane nieprawidłowościami w strukturze i/lub liczbie chromosomów.

Słowa kluczowe:

poronienie, genetyka, badanie cytogenetyczne

Abstract

Abortion is the termination of pregnancy before the end of the 22 week-period, taking as a criterion body weight of fetal miscarriage can also be defined as expulsion of the uterine cavity of the blastocyst weighing less than 500 g. In Poland, pregnancy losses due to abortion, each year over 40 thousand times, which is about 10-20% of clinically recognized pregnancies.

In the etiology of abortions dominant role played by genetic factors. The main condition leading to the emergence of genetic disorders is incorrect number or structure of chromosomes. Two or more spontaneous miscarriages in the first trimester of pregnancy are indications for karyotype testing, in order to analyze the case and determine whether a miscarriage is caused by abnormalities in the structure and/or number of chromosomes.

Key words:

abortion, genetics, cytogenetics testing

Wstęp

Według Amerykańskiego Towarzystwa Położników i Ginekologów (ACOG) poronienie uznane jest za najczęstszą przyczynę niepomyślnego zakończenia ciąży. Poronienie jest to zakończenie ciąży przed końcem 22. tygodnia jej trwania (biorąc pod uwagę kryterium wieku ciążowego). Przyjmując za kryterium masę ciała płodu, poronienie można definiować również jako wydalenie z jamy macicy jaja płodowego o wadze mniejszej niż 500 g. W piśmiennictwie wymienia się wiele czynników będących przyczyną strat ciąż, których udział w etiopatogenezie poronień jest różny. Najczęściej wymienianymi przyczynami występowania poronień są czynniki: genetyczne, anatomiczne, immunologiczne, hormonalne, infekcyjne. Pozostaje duża grupa poronień (30%) o niewyjaśnionej etiologii, są to tzw. poronienia idiopatyczne [1,2,3,4,5,6].

Przyczyny genetyczne

W etiopatogenezie poronień samoistnych dominującą rolę odgrywają czynniki genetyczne. Głównym warunkiem prowadzącym do powstania zaburzeń o podłożu genetycznym jest nieprawidłowa liczba lub struktura chromosomów. Wskazaniem do wykonania badania genetycznego mającego na celu oznaczenie kariotypu jest wystąpienie w I trymestrze ciąży dwóch lub więcej poronień samoistnych oraz urodzenie dziecka z wadą rozwojową o nieznaną przyczynę. Stwierdzono, że aberracje chromosomowe

są przyczyną od 50 do 60% poronień samoistnych w I trymestrze ciąży oraz około 5% poronień nawracających [7,8,9,10,11,12].

Wśród anomalii liczbowych chromosomów wyróżnia się aneuploidie (trisomie i monosomie), a także poliploidie. Około połowę wszystkich aberracji chromosomowych stanowią trisomie autosomów, które najczęściej dotyczą chromosomów 16, 22, 21,15 oraz 13; 15-25% stanowią monosomie chromosomu X; 15% triploidie oraz 5% tetraploidie. Z kolei anomalie strukturalne chromosomów są przyczyną niepowodzeń ciąż w I trymestrze i występują rzadko (stanowią około 6% wszystkich aberracji chromosomowych). Wśród nich wyróżnia się delecje, inwersje, duplikacje i translokacje, ale znaczenie w etiopatogenezie poronień samoistnych (najczęściej nawykowych) przypisuje się tylko translokacjom i inwersjom [7,8,13,14].

Biorąc pod uwagę czynniki genetyczne prowadzące do wczesnych strat ciąż, szczególną uwagę zwraca się na aneuploidie (nieprawidłową liczbę chromosomów). Nieprawidłowości te są uwarunkowane w 25% błędami podczas oogenezy, w 5% błędami spermatogenezy, a w około 10% błędami podziału zygoty. Aberracje liczbowe lub strukturalne chromosomów zarodka mogą mieć różne pochodzenie; mogą powstawać w wyniku dziedziczenia aberracji chromosomowej od jednego z rodziców lub *de novo* – co oznacza, że anomalia chromosomowa powstała podczas tworzenia zarodka przy założeniu, że kariotyp rodziców jest prawidłowy [10,11,13,14].

Jeśli po zbadaniu poronionego materiału stwierdza się aberrację chromosomową, szanse na urodzenie zdrowego dziecka są wyższe niż w przypadku stwierdzenia prawidłowego kariotypu poronionego zarodka, przy założeniu, że para nie jest nosicielem aberracji chromosomowej. Obecność dodatkowego chromosomu w 21 parze w 50% przypadków ciąży kończy się poronieniem. W przypadku trisomii 13 lub 14 pary częstość poronień sięga aż do 99% [12,13,14].

Celem pracy była ocena kariotypu u kobiety ciężarnej z poronieniem zagrażającym.

Opis badania

Badanie zostało przeprowadzone w ramach projektu „MEDFUTURE – Medyczne zawody przyszłości” Działanie 4.3 Program Operacyjny Kapitał Ludzki Uniwersytet Medyczny w Lublinie. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Lublinie – Uchwała numer KE-0254/59/2015.

Studium przypadku

Pacjentka B.Ch., lat 36, piekarz, bez nałogów. Warunki mieszkaniowe oceniła jako dobre. Mieszka na wsi wspólnie z mężem i córką. W momencie zbierania wywiadu była w 18 hbd, w ciąży IV. Zgłosiła się do Izby Przyjęć Ginekologiczno-Położniczej w trybie nagłym z powodu odczuwania silnych dolegliwości bólowych podbrzusza i okolicy krzyżowo-lędźwiowej kręgosłupa. Ciężarna została skierowana i przyjęta na oddział patologii ciąży z rozpoznaniem *abortus imminens*.

Dane o stanie poszczególnych układów:

- tętno: 70 u/min, miarowe;
- ciśnienie tętnicze krwi: 120/70;
- temperatura ciała: 36,6°C;
- tor oddychania piersiowy, 16 oddechów/min, charakter prawidłowy;
- duszności brak;
- drożność dróg oddechowych prawidłowa;
- trudności ze snem – bezsenność;
- wzrok i słuch prawidłowy;
- świadomość pełna;
- czucie dotyku i temperatury prawidłowe;
- pragnienie i łaknienie prawidłowe;
- występowanie dolegliwości bólowych podbrzusza i okolicy krzyżowo-lędźwiowej kręgosłupa;
- stan jamy ustnej prawidłowy;
- trudności z wypróżnianiem – zaparcia;
- ciężar ciała: 57 kg;
- wzrost: 164 cm;
- wskaźnik BMI: 21;
- obniżenie nastroju spowodowane niepokojem pacjentki o utrzymanie ciąży oraz lękiem spowodowanym długotrwałą hospitalizacją.

Dane ginekologiczno-położnicze

Pierwsza miesiączka (*menarche*) pojawiła się w 14. roku życia. Cykle miesiączkowe były nieregularne, krwawienia były obfite. Z reguły trwały około 5-7 dni. W ciągu pierwszych dwóch dni zdarzało się, że pacjentka uskarżała się na silne dolegliwości bólowe podbrzusza z towarzyszącymi im nudnościami i wymiotami. Pacjentka miała nawracające i trudne do leczenia stany zapalne pochwy wywołane przez *Candidia albicans*. Pacjentka miała dwa poronienia. Pierwsze z nich miało miejsce w styczniu 2006 r. w 20. tygodniu ciąży. Było to poronienie dwuczaskowe, przebiegające z szybko postępującym rozwieraniem kanału szyjki macicy oraz silnym krwawieniem z dróg rodnych. U pacjentki przeprowadzono zabieg wyłżeczki jamy macicy w znieczuleniu ogólnym. Do drugiego poronienia doszło w lutym 2009 r. w 10. tygodniu ciąży, było to poronienie jednoczasowe. W roku 2011 pacjentka urodziła drogami i siłami natury CŻN o urodzeniowej masie ciała 2400 g, poród miał miejsce w 35. tygodniu ciąży, był to poród przedwczesny. Zapoczątkowany był pojawieniem się regularnej czynności skurczowej mięśnia macicy oraz pęknięciem pęcherza płodowego i odpłynięciem wód płodowych. W badaniu ginekologicznym *per vaginam* stwierdzono skracanie i rozwieranie się szyjki macicy. wcześniak po urodzeniu otrzymał w pierwszej minucie życia 5 pkt w skali

Apgar i wymagał bezpośrednio po urodzeniu wentylacji. W trzeciej minucie otrzymał 7 pkt, w piątej minucie 8 pkt, w dziesiątej minucie 9 pkt. W obecnej ciąży u ciężarnej przeprowadzono podstawowe badania i oznaczono poziomy hormonów: β -hCG i progesteronu. Pacjentka otrzymała leki: NO-SPA forte 5x1 doustnie, Luteinę 2x1 dopochwowo, Scopolan 2x1 doodbytniczo, kroplówkę rozkurczową w razie potrzeby.

Przebieg badania cytogenetycznego

W celu otrzymania metafaz do analizy cytogenetycznej pacjentki przeprowadzono następujące etapy:

1. Do strzykawki zawierającej heparynę litową pobrano około 10 ml krwi obwodowej i jak najszybciej dostarczono do Pracowni Cytogenetycznej (Zakładu Genetyki Nowotworów). Strzykawka została umieszczona na dwie godziny w cieplarni (37°C), gdzie zachodził proces sedymentacji.
2. W komorze laminarnej założono hodowlę *in vitro* z otrzymanego sedymentu leukocytów. Do naczyń hodowlanych pobrano 15 ml pożywki, która składała się z podłoża RPMI 1640 z L-glutaminą, inaktywowanej płodowej surowicy cielęcej oraz antybiotyku Antimycoticu. Następnie do pożywki dodano zawiesinę leukocytów oraz fitohemaglutyninę w celu stymulacji komórek do podziałów mitotycznych.
3. Hodowle przez 72 godz. prowadzone były w inkubatorze w obecności 5% dwutlenku węgla w temperaturze 37°C.
4. Godzinę przed zakończeniem hodowli do pożywki dodano kolcemid o stęż. 10 μ g/ml w objętości 100 μ l/10 ml hodowli.
5. Zawiesina komórkowa została zlaną z naczyń hodowlanych do plastikowych probówek i wirowana przez 7 minut (100 x g). Następnie odlano supernatant, pozostawiając nad osadem około 1 ml medium.
6. Wstrząsając probówką, za pomocą pipety małymi porcjami dodawano 0,075M KCl. Szok hipotoniczny przeprowadzono w temperaturze 37°C przez 15 minut.
7. Po przeprowadzeniu szoku hipotonicznego mieszanina była wirowana przez 7 minut (100 x g). Następnie supernatant zlaną w taki sposób, że nad osadem pozostawiono około 1 ml KCl.
8. Wstrząsając próbką, do zawiesiny małymi porcjami dodawano utrwalacz (mieszanina kwasu octowego i metanolu w stosunku 1:3) o temperaturze -20°C. Po dodaniu utrwalacza mieszaninę wirowano przez 7 minut (100 x g). Po wirowaniu zmieniono utrwalacz na świeży i powyższą czynność powtórzono trzy razy.
9. Utrwalony materiał odpowiednio rozcieńczony utrwalaczem został naniesiony na szkiełko podstawowe. Przygotowaną zawiesinę komórek suszono w temperaturze pokojowej i odpowiednio barwiono techniką prążków GTG i RHG [15,16].

Prążki G (GTG)

Wysuszone preparaty umieszczano na 2-10 minut w roztworze 10 ml trypsyny i 50 ml buforu PBS. Następnie szkiełko płukano dwa razy w buforze PBS z 0,035% inaktywowanej, płodowej surowicy cielęcej. Preparaty barwiono 10% roztworem barwnika Giemsy, uzyskując wzór prążków G [15,16].

Prążki R (RHG)

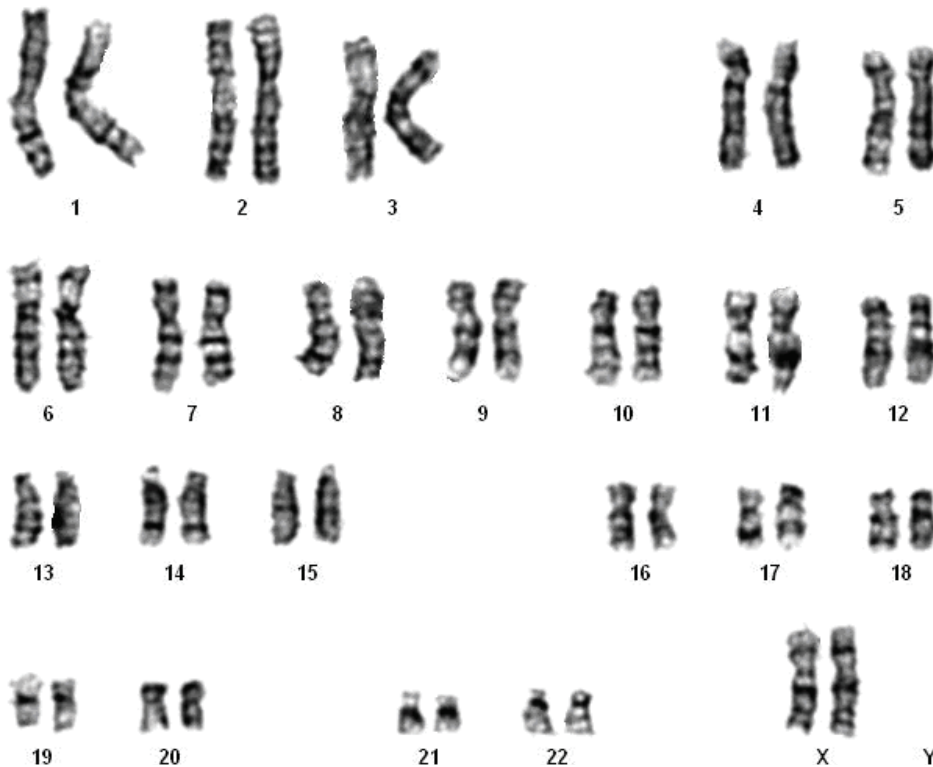
Wysuszone preparaty inkubowano przez około 13 minut w roztworze fosforanowym (pH 4-4,5), w temperaturze 87-88°C. Preparaty opłukiwano wodą i barwiono 10% roztworem barwnika Giemsy przez około 10 minut. W ten sposób uzyskano wzór prążków R [15,16].

Analizę chromosomów przeprowadzono pod mikroskopem świetlnym oraz sporządzono kariogramy pacjentki (ryc. 1-3). W analizowanym przypadku wynik badania cytogenetycznego (określenie kariotypu) był prawidłowy.

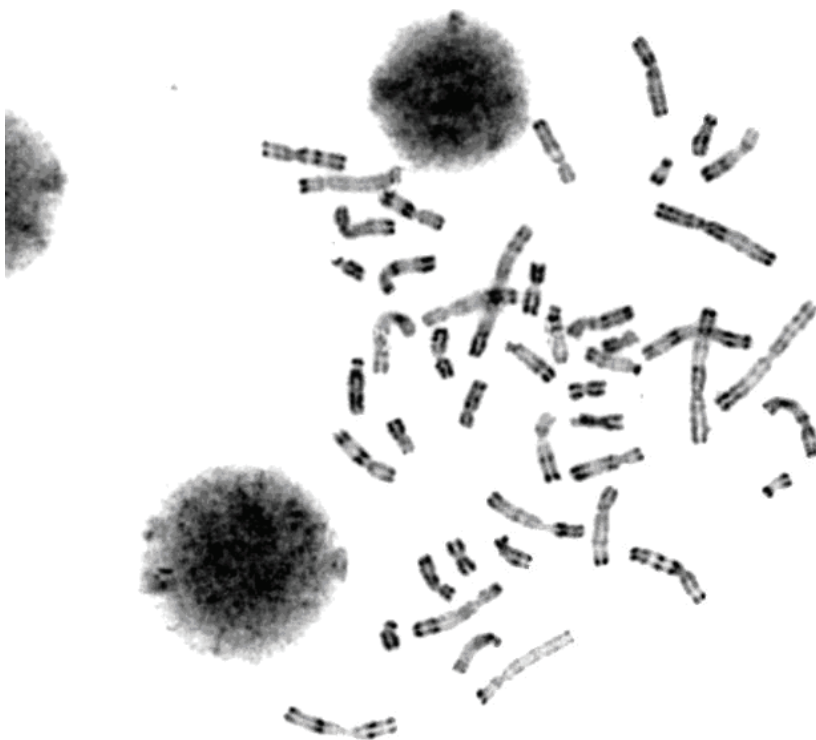
Podsumowanie

Możliwość skorzystania z diagnostyki genetycznej u kobiet z poronieniem w wywiadzie pozwala na

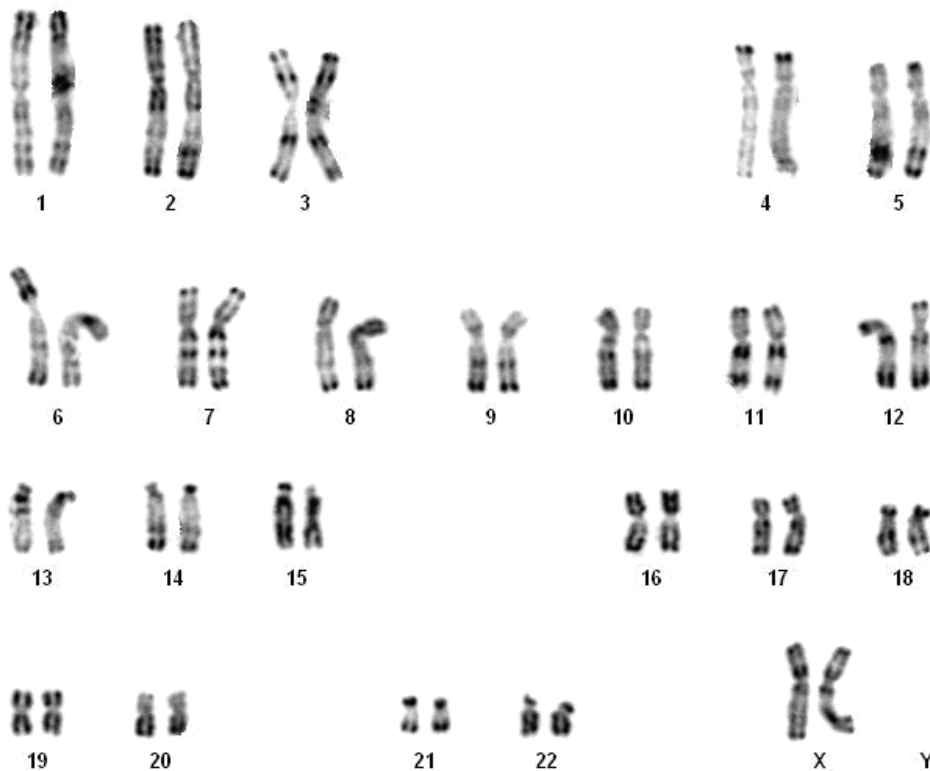
ocenę kariotypu i na wykluczenie bądź potwierdzenie przyczyny genetycznej jako powodu istnienia problemów z utrzymaniem ciąży.



Ryc. 1.
Chromosomy meta-
fazowe. Prążki GTG



Ryc. 3.
Chromosomy meta-
fazowe. Prążki RHG



Ryc. 2.
Karyotyp prawidłowy
46,XX. Prążki GTG

Piśmiennictwo

- Latos-Bieleńska A. Wybrane zagadnienia genetyki w położnictwie i ginekologii. W: Bręborowicz G., Wielgoś M. (red.). Diagnostyka biofizyczna i biochemiczna w medycynie perinatalnej. Położnictwo tom IV. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2012.
- Skrzypczak J. Krwawienia we wczesnej ciąży. W: Bręborowicz G.H. (red.). Położnictwo. Podręcznik dla położnych i pielęgniarek. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2005.
- Skrzypczak J. Poronienie. W: Bręborowicz G.H. (red.). Ciąża wysokiego ryzyka. Wydawnictwo Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań 2010.
- Szkodziak P., Paszkowski T., Paszkowski M., Rado mański T.: Poronienie. W: Bręborowicz G., Paszkowski T. (red.). Medycyna maczyno- płodowa. Położnictwo tom II. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2012.
- Bucholc M. Pielęgowanie ciężarnej z poronieniem zagrażającym. W: Łepecka-Klusek C. (red.). Pielęgniarstwo we współczesnym położnictwie i ginekologii. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2010.
- Gorzelnik K., Bijok J., Zimowski J. G. i wsp. Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna trisomii 21,18 i 13 z wykorzystaniem wolnego pozakomórkowego DNA płodu. Ginekologia Polska 2013; 84, 8: 714-719.
- Bal J. Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.
- Lewicka M., Sulima M., Pyć M., Stawarz B. Charakterystyka poronień i prawa przysługujące kobiecie po stracie ciąży. Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie 2013; 59, 1: 123-129.
- Zając M., Skołodrzy J., Kołowska J., Materna-Kiry luk A., Dmochowski T., Latos-Bieleńska A. Poronienie samoistne jako sygnał wskazujący na rodzinę ryzyka genetycznego – opis przypadku. Ginekologia Praktyczna 2009; 3: 50.
- Michalak M., Darmochwał-Kolarz D., Leszczyńska-Gorzela B., Oleszczuk J. Przyczyny, diagnostyka i leczenie poronień nawykowych – część I. Gin Pol Med Project 2011; 1, 19: 15-30.
- Michalak M., Darmochwał-Kolarz D., Leszczyńska-Gorzela B., Oleszczuk J. Przyczyny, diagnostyka i leczenie poronień nawykowych – część I. Gin Pol Med Project 2011; 1, 19: 15-30.
- Skrzypczak J., Kwinecka-Dmitriew B., Zakrzewska M., Latos-Bieleńska A. Czy i jak często aberracje chromosomowe zarodków powtarzają się w kolejnej ciąży? Ginekologia Polska 2010; 81, 9: 681-686.

13. Latos-Bieleńska A., Wybrane zagadnienia genetyki w położnictwie i ginekologii. W: Bręborowicz G., Wielgoś M. (red.). Diagnostyka biofizyczna i biochemiczna w medycynie perinatalnej. Położnictwo tom IV. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2012: 1-30.
14. Szkodziak P., Paszkowski T., Paszkowski M., Radomański T.: Poronienie. W: Bręborowicz G., Paszkowski T. (red.). Medycyna matczyno-płodowa. Położnictwo tom II. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2012: 1-9.
15. Ferenc T., Mordalska A., Bratkowska W.: Cytogenetyka. W: Drewna G., Ferenc T. (red.). Genetyka medyczna. Podręcznik dla studentów. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2012.
16. Bocian J., Limon J.: Metody badań cytogenetycznych. W Bala J. (red.) Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. Wydawnictwo PWN, Warszawa 2001: 95-115.