

Morphology and karyotype in early abortion

Citation for published version (APA):

van Lijnschoten, G. (1993). *Morphology and karyotype in early abortion*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19931202gl>

Document status and date:

Published: 01/01/1993

DOI:

[10.26481/dis.19931202gl](https://doi.org/10.26481/dis.19931202gl)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Early spontaneous abortion is a common phenomenon, with more than 50% of early cases showing chromosomal abnormalities. There are several reasons why it is interesting to know the karyotype of an abortion. Firstly, couples who have had an abortion with an extra chromosome 13, 18 and 21, which make up 10% of all abortions, are said to have an increased risk of a chromosomally abnormal child in future pregnancy. Secondly, few abortions have an unbalanced structural abnormality, which is the result of a balanced abnormality in one of the parents in many cases. These parents have a high recurrence risk of an unbalanced chromosomal constitution in a future pregnancy.

It is practically impossible to karyotype all spontaneous abortions. The value of microand macroscopical examination of abortions is described in chapters 3 to 7. In chapter 8 the role of cytomegalovirus infection as a cause of abortion is described. Finally, the merit of fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed paraffin-embedded abortions is reported.

Microscopy

The first aim of the study was to evaluate the reproducibility of histological diagnosis of features associated with chromosomal abnormality. An intra- and inter-observer variation study was conducted (chapter 3). Slides of early placentae of 95 abortions were screened for several histological features by three independent observers. The agreement beyond chance was expressed by Cohen kappas.

Good intra-observer kappa coefficients

were found for size, shape, number of blood vessels, basophilic staining under the basement membrane and the number of trophoblastic pseudo-inclusions. For hydrops, trophoblastic hyperplasia, the number of syncytial knots and trophoblastic buds in the intervillous space, kappa values were acceptable for at least two observers.

Considerably lower agreement beyond chance was found in the inter-observer variation study. The best results for all three observers together were obtained for size and shape of the chorionic villi and for the number of pseudo-inclusions.

Thus, the intra-individual variation for most histological features, claimed to be associated with karyotypically abnormal abortions, was small. However, the agreement beyond chance between two or more observers in judging histological features of early abortion placentae only reached clinically relevant values for size and shape of the chorionic villi and for the number of trophoblastic pseudo-inclusions.

The second aim of the study was to evaluate the value of the histological features studied in chapter 4 for prediction of chromosomal abnormality. To this end, slides of 83 early spontaneous abortions were used. The a priori chance of chromosomal abnormality was 60%.

Assessments and karyotype were compared and likelihood ratios computed.

For none of the features all three observers did reach likelihood ratios of ≤ 0.40 or ≥ 2.50 , corresponding with a chance of chromosomal abnormality of $\leq 40\%$ and $\geq 80\%$, respectively. Likelihood ratios of ≥ 2.50 were obtained for lacunar stromal hydrops, presence of

trophoblastic hyperplasia, moderate to abundant trophoblastic hyperplasia, presence of trophoblastic lacunae, few intervillous fibrin deposits and few intervillous trophoblastic buds. Likelihood ratios of ≤ 0.40 were found for small chorionic villi and presence of basophilic staining. Lacunar stromal hydrops and trophoblastic lacunae were predictive of triploid karyotype, but not specific for any other type of chromosomal abnormality.

After application of data previously obtained on Cohen kappas, lacunar stromal hydrops, moderate to abundant trophoblastic hyperplasia and presence of trophoblastic lacunae remained as possibly useful features, again mainly pointing to triploidy.

Most of the items claimed to be related to abnormal karyotype, however, were not predictive at all.

In chapter 5 chorionic villus size and proliferation of trophoblast of 82 placentae were quantified by use of a point counting method. The results were related to karyotype and gestational age.

At the group level there appeared to be no difference in the median mean cross-sectional villus-, stromal and trophoblastic area, trophoblast/stroma ratio and trophoblastic thickness between chromosomally normal and abnormal placentae. Of the abnormal placentae only triploid placentae showed areas larger than normal and other abnormal placentae. Villous profile area increased with gestational age in triploid placentae, but decreased in trisomic abortions.

At the individual case level parameter values outside the 'normal' range appeared to be rather insensitive, but highly specific for the prediction of karyotypic aberrations, again mainly triploidy.

This finding confirms the conclusion of the study described in chapter 4 that morphology of the chorionic villi is not

of any help in the detection of abnormal karyotypes other than triploidy.

In chapter 6 it was determined whether features said to be related to karyotype were in fact related to degeneration. To this end, morphology of a series of induced ($n=6$) and of spontaneous ($n=24$) trisomic abortions were compared.

The chorionic villi of induced abortions were large and of irregular contour. The stroma contained many blood vessels and did not show fibro-hyalinic change. The intact trophoblast demonstrated 'hyperplasia'. Contrastingly, spontaneous abortions were composed of smaller villi with somewhat more fibro-hyalinic stroma containing a few blood vessels. The trophoblast did not show 'hyperplasia'. However, many syncytial knots were present.

Although some histological features were shown to be related to gestational age, which could not be completely matched for, it was unlikely that duration of pregnancy could account for the observed differences. Analysis restricted to induced and spontaneous abortions of comparable gestational age demonstrated the same differences.

Longer time-lags between first blood loss and final gestational loss in spontaneous abortions appeared to be associated with less hydrops and more frequent loss of trophoblastic continuity.

The striking histological differences between induced and spontaneous abortions are mainly considered to be due to cessation of circulation at some time and to disintegration of trophoblast as a result of ischaemia in spontaneous abortions.

Macroscopy

Since it was concluded that microscopy was of little help for determining karyo-

type, the value of macroscopical features was examined in a consecutive series of 98 early spontaneous abortions (chapter 7). Normal karyotype was found in 38 and abnormal karyotype in 57 abortions.

The macroscopical descriptions made at the time of initiation of the cell cultures for chromosome analysis were analyzed. The results indicated that the presence of an embryo as such is not predictive for karyotype. However, very early developmental arrest (the nodular/stunted or cylindrical embryo) is suspect for chromosomal abnormality. Also, the presence of an umbilical cord stump seems to be highly indicative for a chromosomal abnormality. Almost all specimens with large vesicles were triploid. Long, thin stem villi with branches at their terminal ends only, were present in the karyotypically abnormal group solely. On the other hand bichorial twinning seems to be strongly related to normal karyotype, whereas, all monochorial and diamniotic twins were chromosomally abnormal.

Cytomegalovirus

The role of cytomegalovirus (CMV) infections in early pregnancy failure is examined in chapter 8. If there is a role for CMV, a preponderance of infections would be expected in the chromosomally normal group. Furthermore, an increased prevalence of CMV was expected in women with spontaneous abortions compared to women with induced abortions or to nonpregnant women. Therefore, 80 spontaneous and 9 induced abortions with known karyotype, 55 endometrial biopsies and 10 menstruum were screened for the presence of phosphoprotein pp65, an early CMV antigen.

The protein was present in the glandu-

lar epithelium of the decidua of spontaneous as well as induced abortions in 31 out of 89 (35%) cases, irrespective of chromosomal constitution. Trophoblastic cells were positive in 6 cases. A total of 17 embryos could be studied, 7 of which were positive. Positive staining of embryonic organs correlated strongly with the presence of the antigen in the decidua. The endometrial biopsies and menstrual discharges from women of comparable ages showed the same percentages of positive tests for pp65.

These findings indicate that in early pregnancy cytomegalovirus is transmitted from the decidual glands to the foetus. However, the presence of cytomegalovirus infection as shown by the presence of antigen is most probably not pathogenic in early pregnancy.

Fluorescence in situ hybridization

A fluorescence in situ hybridization (FISH) procedure was used to detect chromosome abnormalities in 18 archival abortion specimens. Probes for repetitive centromeric sequences of chromosomes 1, 16, 18, X and Y were used. For each chromosome, 200 nuclei were scored without knowledge of the karyotype.

The FISH results obtained were compatible with the cytogenetic data in 14 cases. However, three abortions proved to be mosaic trisomic for chromosome 16 or 18, whereas this had not been found in traditional karyotyping. One case of mosaic 18q+ unexpectedly proved to be mosaic trisomy 18 with the FISH-method.

In conclusion, FISH can be used to study the presence of chromosome abnormalities in abortion material, retrospectively.

Samenvatting

Spontane abortus voor de 17^e week van de zwangerschap komt veel voor. In meer dan de helft van de abortus is een chromosomale afwijking aanwezig. Paren die een abortus hebben gehad met een extra chromosoom 13, 18 of 21 lopen waarschijnlijk een verhoogd risico voor het krijgen van een kind met een extra chromosoom in de toekomst. Paren die een abortus hebben gehad met een structurele chromosoomafwijking zijn in veel gevallen zelf drager van een chromosomale afwijking en hebben een sterk verhoogd risico op een afwijkend kind in de toekomst.

Het is praktisch onmogelijk om chromosoomonderzoek van alle abortus te verrichten. De waarde van micro- en macroscopisch onderzoek, de rol die cytomegalovirus heeft bij vroege abortus en de mogelijkheid fluorescentie in situ hybridisatie te gebruiken voor chromosoomonderzoek van opgeslagen abortusweefsel zijn onderzocht.

Microscopie

In hoofdstuk 3 wordt beschreven dat de intra-observer variatie bij de beoordeling van histologische kenmerken geassocieerd met chromosomale afwijkingen van abortusweefsel acceptabel is. Met andere woorden: een persoon beoordeelt eenzelfde preparaat consequent.

De variatie tussen personen bleek veel groter. De verschillende waarnemers beoordeelden alleen de grootte en vorm van de placentavlokken en het aantal pseudo-inclusies, 'insluitlichaampjes', op gelijke wijze.

Het tweede doel van de studie verricht voor dit proefschrift, was vast te stellen

of een aantal histologische kenmerken bij sommige waarnemers een afwijkend chromosoompatroon van de abortus kon voorspellen met een hogere mate van zekerheid dan de, in de gebruikte populatie, à priori kans van 60% op aanwezigheid van een chromosomale afwijking (hoofdstuk 4). Tevens werd gebruik gemaakt van de in hoofdstuk 3 verkregen kennis over reproduceerbaarheid.

Lacunaire hydrops van het vlokstroma, uitgesproken trofoblast hyperplasie en de aanwezigheid van trofoblastaire lacunae bleken de enige bruikbare histologische parameters voor het herkennen van chromosomale afwijkingen. Hiermee werden echter voornamelijk triploïde abortus opgespoord. De voor de klinische praktijk meer relevante abortus met een extra chromosoom of een structurele afwijking waren niet van de chromosomaal normale abortus te onderscheiden. De meeste kenmerken bleken ongeschikt voor het opsporen van welke chromosomale afwijking dan ook.

In hoofdstuk 5 zijn grootte van de placentavlok en de mate van trofoblasthyperplasie gemeten met behulp van een punten tel-methode. Ook op deze manier onderscheidde de abortus met chromosomale afwijkingen, anders dan triploïdie, zich niet van de chromosomaal normale abortus.

In hoofdstuk 6 is onderzocht of histologische kenmerken, waarvan gezegd wordt dat ze met het chromosoompatroon verband houden, in feite een gevolg zijn van degeneratie van het weefsel ten gevolge van sterven van het embryo.

Het bleek dat placenta's van afbre-

kingen verricht op sociale indicatie grotere en onregelmatiger placentavlokken, meer bloedvaten, minder vlokfibrose en een prominentere trofoblastlaag hadden dan placenta's van spontane abortus. De lengte van het tijdsverschil tussen eerste bloedverlies van de vrouw en het uiteindelijk uitdrijven van de vrucht correleerde negatief met de mate van hydrops van het stroma en de integriteit van de trofoblastlaag.

Macroscopie

Tot nu is gebleken dat microscopisch onderzoek nauwelijks nut heeft voor het herkennen van chromosomale afwijkingen. In hoofdstuk 7 is de retrospectieve studie waarin de waarde van macroscopisch onderzoek van abortus voor het herkennen van chromosomale afwijkingen beschreven. Kenmerken als de aanwezigheid van een embryo met een heel vroeg in de zwangerschap gestopte ontwikkeling, een navelstrengstomp en placentavlokken met blaasvorming of een 'paraplu'-vormig vertakkingspatroon kwamen vaker of alleen bij chromosomaal afwijkende abortus voor. Daarentegen pasten bichoriale tweelingen vooral bij een normaal chromosoompatroon. Deze bevindingen zullen in een prospectieve studie getoetst moeten worden.

Cytomegalovirusinfectie

In hoofdstuk 8 staat beschreven dat Cytomegalovirus (CMV) antigeen in

ongeveer een derde van spontane en geïnduceerde abortus gelijk verdeeld over de chromosomaal normale en abnormale abortus voorkomt. Ook buiten de zwangerschap wordt het antigeen in een derde van de baarmoederslijmvliesmonsters aangetroffen. Aanwezigheid van antigeen in decidua van de moeder bleek in hoge mate te correleren met aanwezigheid van antigeen bij het embryo. Histologisch was er geen verschil tussen monsters met en zonder CMV antigeen. De bevindingen passen bij de hypothese dat heel vroeg in de zwangerschap overdracht van het virus van moeder naar kind plaats vindt. Overdracht voordat het embryo het virus als lichaamsvreemd kan herkennen, waarschijnlijk voor de 14^e week van de zwangerschap, lijkt niet schadelijk voor de zwangerschap te zijn.

Fluorescentie in situ hybridisatie

In het laatste onderzoek is beschreven dat chromosomaal onderzoek van abortusweefsel opgeslagen in het archief ook na jaren nog mogelijk is. Fluorescentie in situ hybridisatie (FISH) levert in tegenstelling tot karyotypering beperkte informatie over het chromosoompatroon op, namelijk alleen over dat deel van het patroon waar de gebruikte probe voor kodeert. Verschillen tussen traditionele karyotypering, waarbij alleen het vlokstroma onderzocht wordt, en de in situ hybridisatie, waarbij ook de trofoblast cellen worden geanalyseerd, kunnen verklaard worden door placenta-mosaïcisme.

Dank U wel,

'Experienced reseachers generally devote a considerable amount of time and energy to planning a study. A research question may be put forth first in a broad and ambitious fashion, unsuitable for a specific investigation. The original statement is inevitably narrowed and made more precise as a study is designed to evaluate aspects of one or more specific hypotheses. Issues such as the populations available for study, the possibilities of obtaining pertinent information on the exposures of interest, and other constraints such as time and cost, often lead to a modification of the original question, so that usually only a portion of the larger, more general question will be approached by any single investigation.'

Citaat uit Schlesselman, JJ. Case-control studies: design, conduct and analysis. Oxford University Press, 1982, p69.

Dit proefschrift is een voorbeeld van de gang van zaken die in het bovenstaande citaat is weergegeven.

Vele mensen hebben meegedaan aan het 'abortus-project'. Dit project was breed opgezet: patienten van de polikliniek Infertiliteit werden enkele maanden vervolgd, waarbij bloedmonsters en menstruum verzameld werden, naast de vele echoscopische en semen-onderzoeken. Dit alles om te zien of heel vroege 'verborgen' miskramen, dit is voordat de menstruatie verwacht kon worden (=13^e dag na de eisprong), bij deze mensen voorkwamen. Daarnaast werd gekeken of afwijkende uitslagen van het vruchtbaarheidsonderzoek met het krijgen van miskramen correleerden.

Het pathologisch onderzoek van de miskramen was slechts een onderdeel van het totale 'abortus-project'.

Het bleek dat 'verborgen' miskramen bij de 135 patiënten-paren met vruchtbaarheidsproblemen niet voorkwamen. Een belangrijke bevinding, doch voor de voortgang van het onderzoek niet zo gewenst.

Voor alle duidelijkheid, het PA-onderzoek betrof al gauw alle 'klinische' miskramen die zich in de kliniek voordeden en voor onderzoek aangeboden werden door assistenten en staf van de afdeling Obstetrie & Gynaecologie.

Het zal U duidelijk zijn dat een zo omvangrijk project niet zonder hulp van anderen kon plaatsvinden:

De medewerkers van de polikliniek, de verloskamers, de operatie-kamers en de prikdienst waren onmisbaar om de patienten die aan het project deelnamen op te vangen, te voorzien van briefjes en potjes, bloed af te nemen en te zorgen dat opgevangen weefsel van menstruatie of miskraam bij mij terecht kwam.

De arts-assistenten en stafleden van Obstetrie & Gynaecologie dank ik voor het insluizen van patiënten en aanbieden van de miskramen.

Alle medewerkers van de laboratoria voor bloedtransfusie/immunologie en chemie 6 dank ik voor de enthousiaste en uitstekende zorg voor de vele bloedmonsters en uitslagen.

Hetzelfde geldt voor de onderzoekers van het semen, in de oudbouw verricht door de analisten van het zaadlabje bij de afdeling Pathologie en in de nieuwbouw door de analisten van het IVF-laboratorium. Hiervan wil ik met name Angela Reynen-Beek noemen, die mij bovendien coupes leerde snijden.

De medewerkers van Genetica, van wie ik leerde weefselkweken in te zetten en chromosomen te knippen, hebben een essentieel steentje bijgedragen aan het onderzoek. Het verversen, afwerken en analyseren van de kweken werd door hen verricht. Met name wil ik Ruud Aarts noemen, die speciaal voor het project werd aangesteld.

Van de medewerkers van de afdeling Pathologie leerde ik hoeveel er nodig is voordat weefsel zoals dat op PA-lab binnenkomt, tot enkele μm dunne gekleurde coupes voor histologische beoordeling geschikt is gemaakt. Ik wil jullie allemaal bedanken voor de ruimte en hulp die ik, letterlijk en figuurlijk, kreeg om het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift uit te voeren.

Als je zolang ergens werkt kom je mensen tegen die er om wat voor een reden dan ook in positieve zin uitspringen en essentieel zijn voor het tot een goed einde brengen van het werk.

Leonie, je kwam op het goede moment, ik zag het niet meer zitten.

Prof.dr JW Arends raakte in een latere fase bij het onderzoek betrokken en zorgde dat het onderzoek 'vorm' kreeg.

Prof.dr JPM Geraedts, Joep, het is gelukt en ik ben er trots op dat je mijn promotor bent,

Ineke.