

УДК 618.33:612.64

Е.И. ГОЛОВАТАЯ

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ПРЕНАТАЛЬНОГО КАРИОТИПИРОВАНИЯ

A difference in the diagnostic performances of cytogenetic investigation in amniotic fluid (AF) cells and chorionic villus sample (CVS) was investigated. Any differences in success rate between AF-samples and CVS were not found. Frequency of mosaicism and maternal cell contamination was more often in CVS. The simultaneous analysis of short term and long term culture in CVS minimize the proportion of both false-negative and false-positive results.

Задача диагностики, профилактики и лечения наследственных болезней человека становится с каждым годом все более значимой. Это объясняется как изменением структуры заболеваемости и смертности в раннем детском возрасте, так и значительным усовершенствованием лабораторных методов исследования.

В Беларуси в год рождается свыше 3,5 тыс. детей с наследственной и врожденной патологией [1].

Невозможность лечения хромосомных заболеваний и, как следствие, пожизненная инвалидность делают в настоящее время проблему профилактики рождения детей с хромосомными нарушениями особенно актуальной. Решающая роль в профилактике принадлежит пренатальной диагностике. Использование в практическом здравоохранении методов дородовой диагностики хромосомных aberrаций позволяет предупредить рождение детей с тяжелой патологией. В Беларуси в инвазивных методах пренатальной диагностики, наиболее точных, но и самых сложных и дорогостоящих, нуждается ежегодно 4,5-5 тыс. беременных [1]. Цитогенетические исследования с целью кариотипирования плода составляют заключительную и важную часть работы по пре-натальной диагностике врожденных и наследственных заболеваний.

Биологическим материалом служат клетки амниотической жидкости, ворсин хориона и плаценты, пуповинной крови плода. Однако сведения о результативности и диагностической значимости разных методов в литературе существенно отличаются.

Популяции клеток амниотической жидкости, ворсин хориона и плаценты имеют гетерогенный состав, что отражает их различное происхождение и является причиной мозаицизма как истинного, так и подтверждаемого только в эмбрионе или только в плаценте [2-4]. Известно, что данные цитогенетического анализа не всегда соответствуют реальному кариотипу плода, что трактуется как ложноположительные или ложноотрицательные результаты. В определенной мере эффективность кариотипирования клеток биоптата ворсин хориона зависит от метода исследования («полупрямой» или длительное культивирование). Однако и здесь нет единого мнения [5-8].

Нашей целью явилось сравнительное изучение цитогенетической диагностики клеток амниотической жидкости, биоптата ворсин хориона и пла-

центры по следующим параметрам: результативность, контаминация материнским материалом, уровень мозаицизма.

Материал и методика

Цитогенетическое исследование клеток амниотической жидкости, биоптата ворсин хориона и плаценты проводилось с помощью стандартной методики GTG-banding [4]. До посадки культуры клеток биоптата ворсин хориона и плаценты под контролем стереомикроскопа в стерильных условиях производился отбор материала плода от материнских тканей. Если количество взятого материала превышало 10 мг, работа выполнялась в два этапа: сначала использовался «полупрямой» метод (короткая культура), затем - анализ длительной культуры [4]. Полупрямой метод предполагает инкубирование нативных ворсин в культуральной среде до 24 ч и базируется на исследовании спонтанно делящихся клеток цитотрофобласта. Длительное культивирование занимает 2-3 недели, при этом анализируются в основном клетки мезенхимного слоя ворсин. Нормальным считался кариотип, который можно было описать следующими формулами: 46,XX, 46,XY или 46,XX(Y),inv(9)(p11;q13). Во всех остальных случаях кариотип рассматривался как аномальный. При кариотипировании клеток биоптата ворсин хориона и плаценты цитогенетический результат определялся как мозаичный, если при анализе не менее десяти метафазных пластинок кариотип хотя бы в двух клетках отличался от остальных. Случаи, характеризовавшиеся несоответствием между кариотипом плода и клеток биоптата ворсин хориона или плаценты, относились к плацентарному или генерализованному мозаицизму. Сочетание нормального кариотипа в тканях плода с аномальным в короткой, длительной или одновременно в обеих культурах биоптата ворсин хориона определялось как плацентарный мозаицизм I, II или III типа соответственно. Присутствие аномального клеточного клона в тканях плода при его наличии в плаценте характеризовалось как генерализованный мозаицизм IV (аномальный кариотип в короткой культуре), V (аномальный кариотип в длительной культуре) или VI (аномальный кариотип в обеих культурах) типов [2, 6]. Соответствие полученных кариотипов истинным проверялось при последующем анализе клеток амниотической жидкости или патоморфологическом исследовании, включавшем цитогенетический анализ эмбриональных фибробластов. При исследовании клеток амниотической жидкости кариотип определялся как мозаичный, если аномальные клетки присутствовали, как минимум, в двух независимых культуральных сосудах.

Анализ результативности цитогенетического исследования клеток амниотической жидкости, биоптата ворсин хориона и плаценты, а также уровня мозаицизма проводился с использованием архивного материала и учетной документации генетической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Мать и дитя». За период 1996-2004 гг. было выполнено 10 990 цитогенетических анализов клеток амниотической жидкости, 1987 анализов клеток биоптата ворсин хориона и 644 анализа клеток биоптата ворсин плаценты. Большинство образцов амниотических вод (77,33 %) взято в сроке 16-20 недель беременности, 721 образец (6,56 %) был прислан по почте. Биопсия ворсин хориона в 83,64 % случаев проводилась в сроке беременности 11-13 недель, ворсин плаценты - с 14-й по 36-ю неделю. В 417 случаях (64,75 %) биопсия ворсин плаценты производилась одновременно с взятием амниотических вод.

Результаты и их обсуждение

Результативность цитогенетического исследования клеток амниотической жидкости варьировала от 99,03 до 99,91 %, в среднем 99,74 %. Среди присланных образцов этот показатель равнялся 98,75 %, среди остальных - 99,81 %. Таким образом, анализ образцов амниотической жидкости, присылаемых по почте, является высокоэффективным. Кариотип не был установлен в 29 образцах амниотических вод (0,26 %), основная причина - отсутствие рос-

та. Согласно другим исследованиям результативность получения кариотипа клеток амниотической жидкости изменялась в пределах 70-99,9 % [9-12].

Кариотип был установлен в 1943 образцах биоптата ворсин хориона из 1987 (97,79 %). По данным литературы, результативность составляет 97,2-99,97 % [9-12]. Для всех образцов была посажена короткая культура, кариотип установлен в 1906 исследованиях (95,92 %). Причиной лабораторных неудач явилось неудовлетворительное качество препаратов, а именно отсутствие или недостаточное количество метафазных пластинок, неадекватный разброс хромосом. С 2001 г. при достаточном количестве материала всегда проводилась посадка длительной культуры. Результативность кариотипирования составила 94,26 %.

Для клеток биоптата ворсин плаценты исследовалась только короткая культура. Кариотип был установлен в 81,06 % образцов. Основной причиной неудач явилось недостаточное количество или отсутствие метафазных пластинок. Была выявлена связь между получением кариотипа и сроком беременности: после 22-й недели результативность значительно снижается, а после 27-й составляет всего 60 %. Это связано, по-видимому, с уменьшением митотического индекса ворсин плаценты при большом сроке беременности [13].

При исследовании клеток амниотической жидкости нормальный кариотип был установлен в 10 561 образце (96,34 %), сбалансированные транслокации и инверсии - в 111 образцах (1,01 %). Хромосомные болезни выявлены в 291 случае (2,65 %), из них синдром Дауна - в 138 случаях (47,42 %). Нормальный кариотип при анализе клеток ворсин хориона был установлен в 1728 случаях (88,93 %), сбалансированные перестройки хромосом - в 24 (1,24 %). Выявлен 191 плод (9,83 %) с хромосомными болезнями, из них с синдромом Дауна - 82 (42,93 %). В результате пренатального кариотипирования клеток биоптата ворсин плаценты нормальный кариотип наблюдался в 463 случаях (88,70 %), сбалансированные перестройки хромосом - в 4 (0,77 %). Выявлено 52 плода (9,96 %) с хромосомными болезнями, из них с синдромом Дауна - 14 (26,92 %). Спектр патологий, устанавливаемых при анализе клеток амниотической жидкости, биоптата ворсин хориона или плаценты, одинаков. Процент обнаружения хромосомных болезней при цитогенетическом исследовании клеток биоптата ворсин хориона и плаценты в нашем материале оказался больше по сравнению с амниотической жидкостью ($P < 0,05$), что связано с проведением биопсии ворсин хориона и плаценты у женщин в случаях более высокого генетического риска, т. е. вероятности выявления хромосомной патологии плода [14].

Проблеме хромосомного мозаицизма в пренатальной диагностике уделяется особое значение в связи с тем, что накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о совместимости с внутриутробным развитием и живорождением многих аутомсомных трисомий. Для интерпретации результатов пренатальной диагностики принципиальное значение имеют особенности происхождения анализируемого материала. В состав амниотической жидкости входят как истинно плодные, так и относящиеся к амниотическому эпителию клетки. Соответственно выявляемый при кариотипировании мозаицизм может отражать как тканевый мозаицизм плода, так и мозаицизм амниотических оболочек.

В нашем исследовании мозаицизм при кариотипировании клеток амниотической жидкости составил 0,23 %, в 36 % он был связан с трисомиями аутомсом, ложноположительный результат получен в четырех анализах (0,04 %), ложноотрицательных результатов не было. Наши данные согласуются с имеющимися в литературе: мозаицизм в культуре клеток амниотической жидкости встречается с частотой 0,1-0,3 % [15-17].

Анализ уровня мозаицизма, частоты ложноположительных и ложноотрицательных результатов при кариотипировании клеток биоптата ворсин хориона проводился только для образцов, исследованных двумя методами (всего

1145). При кариотипировании биоптата ворсин хориона и плаценты может быть выявлен мозаицизм тканей плода, трофобласта (в короткой культуре) или клеток мезодермального слоя ворсин (в длительной культуре) [5-8]. Мозаичный кариотип был установлен в 23 (1 %) цитогенетических исследованиях. Не было образцов с мозаицизмом в короткой и длительной культурах. В короткой культуре мозаицизм встречался в 15 анализах (1,31 %), в длительной - в 8 (0,7 %), однако не было выявлено различий по его уровню при исследовании короткой и длительной культур ($P > 0,05$). Данные литературы варьируют от одинаковой частоты мозаицизма при анализе ворсин хориона двумя методами до меньшей частоты в длительной культуре [18, 19].

Мозаицизм при исследовании клеток биоптата ворсин хориона встречался чаще по сравнению с амниотической жидкостью ($P < 0,01$).

Плацентарный мозаицизм составил 1,3 %: I тип - 0,7 % (8 случаев), II тип - 0,52 % (6 случаев) и III тип - 0,08 % (1 случай). В 40 % он был связан с трисомиями аутосом. В трех образцах установлена полная дискордантность кариотипов в клетках короткой и длительной культур.

Генерализованный мозаицизм наблюдался в 13 образцах (1,14 %) со следующим распределением по типам: IV - 0 %, V - 0,26 %, VI - 0,88 %. В 62 % случаев он связан с трисомиями аутосом. В четырех образцах выявлена абсолютная дискордантность кариотипов, полученных в короткой и длительных культурах.

Таким образом, при анализе короткой культуры были получены три ложноотрицательных результата (0,26 % - V тип) и девять ложноположительных (0,78 % - I и III типы), при исследовании длительной культуры - шесть ложноположительных (0,6 %-II и III типы). Из приведенных данных очевидно отсутствие достоверных различий по частоте ложноположительных и ложноотрицательных результатов, полученных при исследовании короткой и длительной культур ($P > 0,05$). Однако следует отметить, что при анализе длительной культуры ложноотрицательных результатов не было. Любое расхождение кариотипов в короткой и длительной культурах требует дополнительных исследований, в нашей работе необходимость в их проведении (амнио- или кордоцентез) возникла в 2,44 % случаев, из них в 0,61 % наблюдалась полная дискордантность кариотипов в клетках короткой и длительной культур.

В литературе данные по частоте плацентарного мозаицизма колеблются от 0,8 до 3 % [7, 8, 19]. Большинство исследователей указывают на более частую встречаемость плацентарного мозаицизма I типа и редко - III типа [6, 7, 13]. Так, по данным [6], относительная частота плацентарного мозаицизма I, II, III типов и генерализованного мозаицизма IV, V, VI типов составляет 48, 25, 16, 0, 4 и 7 % соответственно. Однако в работе [20] отмечается практически одинаковая частота I и II типа (0,8 и 0,9 %) и низкая - III типа (0,2 %). По нашим данным, наиболее часто наблюдался мозаицизм I, II и VI типов.

Мозаичный кариотип был обнаружен в 6 из 516 исследований (1,16 %) короткой культуры клеток биоптата ворсин плаценты. Частота ложноположительных и ложноотрицательных результатов оценивалась с учетом данных кариотипирования клеток амниотической жидкости. Получено пять ложноположительных результатов (0,99 %), из них полная дискордантность кариотипов наблюдалась в двух случаях, и три ложноотрицательных результата (0,58 %), во всех случаях установлена полная дискордантность кариотипов.

Мозаичный кариотип 46,XX/46,XY был обнаружен нами в 18 образцах амниотических вод (0,16 %). По данным других исследователей, этот показатель не превышает 0,5 % [4, 21]. Установление такого кариотипа в большинстве случаев является ложноположительным результатом и обусловлено контаминацией материнским материалом. При исследовании короткой культуры клеток биоптата ворсин хориона и плаценты проводится кратковременное культивирование, анализируются в основном клетки, активно делящиеся в организме, и риск получения кариотипа 46,XX/46,XY чрезвычайно мал в от-

личие от длительного культивирования. В нашем исследовании всегда проводился отбор материала плода от материнских тканей. Однако в 2,36 % образцов, проанализированных двумя методами, при кариотипе 46,XY в короткой культуре выявлены клетки с кариотипом 46,XX в длительной культуре. Учитывая, что во всех этих случаях роды закончились рождением здоровых мальчиков, можно предположить, что причиной мозаичного кариотипа явилась контаминация материнским материалом. По данным коллаборативных исследований, этот показатель колеблется от 0,5 до 4,2 % [10, 13, 18].

Сравнительная оценка результатов цитогенетической диагностики с использованием клеток амниотической жидкости, биоптата ворсин хориона и плаценты представлена в таблице.

Результаты кариотипирования культур клеток амниотической жидкости, биоптата ворсин хориона и плаценты, %

Показатель	Амниотическая жидкость*	Биоптат ворсин хориона**		Биоптат ворсин плаценты, короткая культура*
		короткая культура	длительная культура	
Результативность получения кариотипа	99,74	95,92	94,26	81,06
Контаминация материнскими клетками	0,16	0	2,36	0
Мозаицизм	0,23	1,31	0,70	1,16
Ложноположительный результат	0,04	0,78	0,60	0,99
Ложноотрицательный результат	0	0,26	0	0,58

Примечание. Сроки получения биопсинного материала: * – 14–36, ** – 9–13 недель беременности.

Таким образом, показано, что результативность пренатального кариотипирования клеток амниотической жидкости во втором триместре и биоптата ворсин хориона в первом триместре беременности высока и составляет 99,74 и 97,79 % соответственно и не различается между собой ($P > 0,05$). Проведение биопсии ворсин плаценты во втором и третьем триместрах беременности значительно уменьшает вероятность получения кариотипа. Частота мозаицизма и контаминации материнским материалом выше при кариотипировании клеток длительной культуры биоптата ворсин хориона по сравнению с амниотической жидкостью.

Наиболее результативным и надежным методом исследования является кариотипирование клеток амниотической жидкости во втором триместре беременности, поскольку этот метод характеризуется малой вероятностью получения ложноположительного либо ложноотрицательного результата. В первом триместре беременности для получения максимальной точности результатов необходимо проводить кариотипирование двумя методами, что снижает риск получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Работа выполнена под руководством члена-корреспондента НАН Беларуси и РАМН, доктора медицинских наук, профессора Г.И. Лазюка.

1. Лазюк Г.И., Прибушеня О.В. // *Здравоохранение*. 2002. № 4. С. 2.
2. Kalousek D.K., Dill F.J. // *Science*. 1983. Vol. 221. P. 665.
3. Henderson K.G., Shaw T.E., Barrett I.J. et al. // *Hum.Genet*. 1996. Vol. 97. P. 650.
4. Rooney D.E., Czepulkowski B.H. *Human Cytogenetics*. Vol. 1. Constitutional Analysis. A practical approach. Oxford, 1992.
5. Farra C., Giudicelli B., Pellissier M.C. et al. // *Prenat. Diagn*. 2000. Vol. 20. №3. P. 190.
6. Hahnemann J.M., Vejerslev L.O. // *Ibid*. 1997. Vol. 17. №9. P. 801.
7. van den Berg C, van Opstal D., Brandenburg H. et al. // *Ibid*. 2000. Vol. 20. P. 956.
8. Sikkema-Raddatz B., Bouman K., Verschuuren-Bemehmans C.C. et al. // *Ibid*. P. 950.
9. Lippman A., Tomkins D.J., Shime J., Hamerton J.L. // *Ibid*. 1992. Vol. 12. P. 385.
10. Smidt-Jensen S., Lind A.M., Permin M. et al. // *Ibid*. 1993. Vol. 13. P. 723.
11. Waters J.J., Waters K.S. // *Ibid*. 1999. Vol. 19. P. 1023.

12. Юдина Е.В., Медведев М.В. Основы пренатальной диагностики. М., 2002.
13. Brun J.L., Mangione R., Gangbo F. et al. // Ibid. 2003. Vol. 23. P. 295.
14. Головатая Е.И., Прибушеня О.В., Гусина Н.Б., Новикова И.В., Лазюк Г.И. // Здоровоохранение. 2005. № 8. С. 38.
15. Hsu L.Y.F., Kaffe S., Jenkis E.C. et al. // Prenat. Diagn. 1992. Vol. 12. P. 555.
16. Rosado L., Perez G., Maza O. et al. // Cuban J. of Hum. Genet. 2000. Vol. 2. №2. P. 57.
17. Worton R.G., Stern R. // Prenat. Diagn. 1984. Vol. 4. P. 131.
18. Ledbetter D.H., Zachary J.M., Simpson J.L. et al. // Ibid. 1992. Vol. 12. P. 317.
19. Kalousek D.K., Barret U., Gartner A. B. // Hum. Genet. 1992. Vol. 88. P. 642.
20. Kalousek D.K., Simoni G. // Placenta. 2002. Vol. 23. № 16. P. 146.
21. Hsu L.Y.F., Perlis T.A. // Prenat. Diagn. 1984. Vol. 4. P. 79.

Поступила в редакцию 25.01.06.

Елена Ивановна Головатая - врач-лаборант клинико-диагностической (генетической) лаборатории Республиканского научно-практического центра «Мать и дитя».

♀P: F1: ♂P

♀P: F1: F2: ♂P