

**АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ СОЧЕТАНИЯ СТАНДАРТНОГО  
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ *IN SITU*  
ГИБРИДИЗАЦИИ (FISH) В ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ****<sup>1</sup>ООО «Медицинский центр ИГР» (г. Киев)****<sup>2</sup>Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина****(г. Харьков)**

Данная работа является фрагментом НИР «Изучение клинко-патогенетических механизмов развития недифференцированной дисплазии соединительной ткани в ремоделировании эластично-тканых структур организма человека», № гос. регистрации 01 12U001027.

**Вступление.** Пренатальная диагностика направлена на предотвращение рождения детей с тяжелыми некорректируемыми пороками развития, прежде всего с хромосомными патологиями. По обобщенным данным мировой литературы, частота врожденных пороков развития (ВПР) составляет 3,5 %, моногенных болезней – 1,4 % и хромосомных синдромов – около 0,6 % среди живорожденных. При этом около 40 % ранней младенческой смертности и инвалидности с детства обусловлены генетическими факторами. [2] В связи с этим необходимость ранней диагностики пороков развития и выявления их причин остается неизменно актуальной.

Основными показаниями к дородовой диагностике в настоящее время являются возраст матери, наличие наследственных заболеваний, отягощенный акушерский анамнез (невынашивание), отклонение от нормы показателей биохимического скрининга по крови беременной, отклонение от нормы при исследовании фетоплацентарной гемодинамики (доплерометрия), выявления нарушений развития плода при ультразвуковом исследовании (УЗИ) в первом (показатели шейной складки, несоответствие размера или отсутствие носовой косточки) и во втором триместрах беременности. Для уточнения и выявления нарушений внутриутробного развития в пренатальной диагностике применяют инвазивные и неинвазивные методы. К неинвазивной относят исследование клеток плода, которые циркулируют в кровяном русле матери, УЗИ в двух-, трех-, четырехмерном формате, магнитно-резонансную томографию (МРТ). Инвазивные методы включают в себя биопсию ворсин хориона/плаценты, амниоцентез, кордоцентез, исследование тканей плода [7]. В первую очередь пренатальная диагностика нацелена на выявление хромосомной патологии, наиболее часто встречающейся трисомии по 21 хромосоме или синдрома Дауна, который остается

наиболее частой аутосомной трисомией с частотой 1,5 на 1000 родившихся младенцев [8].

Наиболее безопасным для плода и здоровья матери является аспирация амниотической жидкости на сроке с 15 недель. Недостатком этого метода является длительное культивирование клеточной культуры в связи с малым количеством жизнеспособных клеток в образце. В связи с этим, времени на выполнение исследования, на рост клеточной культуры и стандартного цитогенетического анализа иногда бывает недостаточно в тех случаях, когда женщина поступает на инвазивную процедуру в сроке беременности 21 неделя и даже в начале 22 недели, так как по медицинским показаниям в Украине прерывание беременности возможно до 22 недель [1]. В подобных случаях необходимо обращаться к применению молекулярно-цитогенетического метода – флуоресцентной *in situ* гибридизации. Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH – fluorescence *in situ* hybridization) заключается в проведении процедуры молекулярной гибридизации ДНК зонда с ДНК фиксированного на стекле материала (интерфазных ядер или метафазных хромосом) с последующим использованием флуоресцентной микроскопии для детекции результатов гибридизации. Метод позволяет анализировать количественные хромосомные нарушения в ядрах не только клеток, находящихся на стадии метафазы, но и интерфазных соматических и половых клеток [3]. Однако метод FISH на интерфазных ядрах не позволяет оценить структурные нарушения хромосомного набора, что является его недостатком по сравнению со стандартным цитогенетическим анализом.

Анализ преимуществ сочетания стандартных цитогенетических и молекулярно-цитогенетических методов для определения хромосомного набора плода после выявления биохимических и УЗИ маркеров хромосомной патологии и стал **целью** данного **исследования**.

**Объект и методы исследования.** Сбор первичной информации проводился на базе цитогенетической лаборатории «Медицинского центра ИГР» (директор – к. мед. н. И. Е. Ильин) в период с 2009 по 2013 гг. Потребность в инвазивной процедуре для определения кариотипа плода определялась для

беременных женщин по следующим показателям: данные о УЗИ маркерах хромосомной патологии, результаты биохимического скрининга I и/или II триместра, подсчет индивидуального комбинированного риска наличия у плода трисомии 21, 13, 18, дефекта нервной трубки. Риск рассчитывался с учетом возраста, массы тела беременной, расы, результатов УЗИ и биохимических показателей с использованием программы Prisca 5,0 (Germany). Аспирация амниотической жидкости выполнялась под контролем УЗИ в сроках от 16 до 21 недели гестации.

Обработаны данные 407 амниоцентезов, при которых проводилось стандартное кариотипирование клеток амниотической жидкости и экспресс-исследование методом FISH. Исследование проводилось по стандартным методикам, оптимизированным и доработанным специалистами лаборатории цитогенетики ООО «Медицинский центр ИГР».

Культивирование клеток амниотической жидкости выполнялось по стандартной методике. Забор материала производился в стерильные пробирки в объеме 15-20 мл. Пробирки с амниотической жидкостью центрифугировались 5 минут, после чего отбиралась надосадочная жидкость. Осадок тщательно ресуспендировался и переносился во флаконы с аэрогенацией для культивирования амниоцитов. К суспензии клеток добавлялось 2 мл питательной среды (Amnio max, производитель Gibco). Затем флаконы помещались в CO<sub>2</sub> – инкубатор при температуре +37°C. Через 5-7 дней выполнялся визуальный контроль роста культуры, а также замена питательной среды. Через 12-15 дней от начала культивирования при наличии сформировавшихся плотных колоний (4-7 на флакон) производилась фиксация культуры. За 18 часов до фиксации сменили питательную среду. По истечении 18 часов во флакон вносился раствор колхицина на 2 часа в объеме 0,25 мл и концентрации 10 мкг/мл. Далее содержимое флакона сливалось в пробирку, клетки со дна флакона смывались раствором Версена и также помещались в пробирку. Клеточная масса с питательной средой центрифугировались, и полученный осадок подвергался гипотонической обработке 0,075M раствором хлорида калия до 20 минут при температуре +37°C. Затем клетки фиксировались в трёх сменах охлажденной +4°C смеси этанол-уксусная кислота в соотношении 3:1, приготовленной ex tempore (перед использованием). После окончательного центрифугирования и удаления супернатанта, суспензия клеток раскапывалась на охлажденные влажные стекла и высушивалась на воздухе. Окрашивание препаратов проводилось GTG-методом. [5]. Для каждого пациента анализировалось 15-30 метафазных пластинок с разрешением 550 сегментов на гаплоидный набор. [4]

Для экспресс-исследования методом FISH использовалась нативная амниотическая жидкость с применением многоцветной пробы AneuVysion для выявления анеуплоидий хромосом X, Y, 18, 13, 21 (Abbott-Vysis, USA). Пробирка с образцом центрифугировалась 5 минут, затем отбиралась

надосадочная жидкость. Полученный осадок подвергался гипотонической обработке 0,075M раствором хлорида калия до 30 минут при температуре +37°C. Далее клетки фиксировались в трёх сменах охлажденной +4°C смеси этанол-уксусная кислота в соотношении 3:1 и после окончательного центрифугирования и удаления супернатанта, суспензия клеток раскапывалась на выделенные зоны, отмеченные на предметных стеклах, и высушивалась на воздухе. Далее проводится предгибридизационная подготовка препарата и наносятся пробы CEP 18/X/Y и LSI 13/21 на предварительно отмеченные зоны гибридизации. Стекло с нанесенными зондами помещалось в гибридизатор с установленной программой денатурации и гибридизации при +37°C длительностью от 4 до 12 часов. Затем для удаления негибридизовавшихся проб, а также с целью уменьшения кросс-гибридизации альфоидных последовательностей с центромерными участками других хромосом, стекла подвергаются отмывке. Далее препараты окрашиваются и проводится детекция флуоресцентных сигналов согласно стандартному протоколу. Микроскопический анализ осуществляется с использованием флуоресцентного микроскопа, оборудованного соответствующим набором фильтров и программой автоматической обработки изображения ISIS (MetaSystems, Germany). Для исследования уровня анеуплоидий в клетках амниотической жидкости проводился анализ 100 клеток [6].

**Результаты исследований и их обсуждение.**

Исследование строилось на данных 407 амниоцентезов по результатам стандартного цитогенетического и молекулярно-цитогенетического анализа.

По итогам стандартного цитогенетического анализа, нормальный кариотип был установлен у 346 (85,01%) пациентов, отклонения различного рода были определены в 51 (12,53%) случае, по 10 (2,46%) образцам результат стандартного кариотипирования получен не был по причине низкого митотического индекса или отсутствия роста культуры клеток.

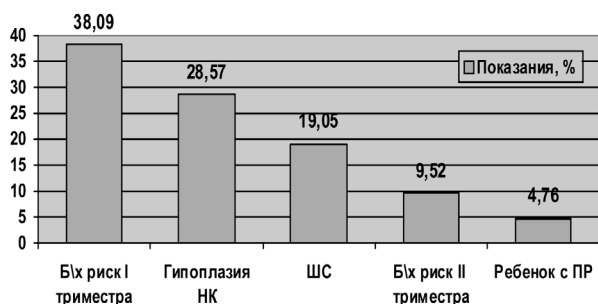
Наиболее частой хромосомной патологией оказалась трисомия по 21 хромосоме, частота которой

Таблица

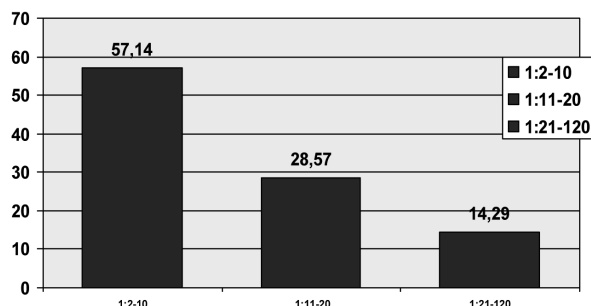
**Распределение нарушений кариотипа среди обследованных образцов амниотической жидкости с выявленными отклонениями.**

Нарушение кариотипа	Частота, %
Варианты нормы	25,0
Сбалансированные перестройки	12,0
Дополнительные маркерные хромосомы	2,0
Триплоидии	4,0
Нарушение числа половых хромосом	6,0
Трисомии:	
трисомия 21	39,0
трисомия 18	10,0
трисомия 13	2,0

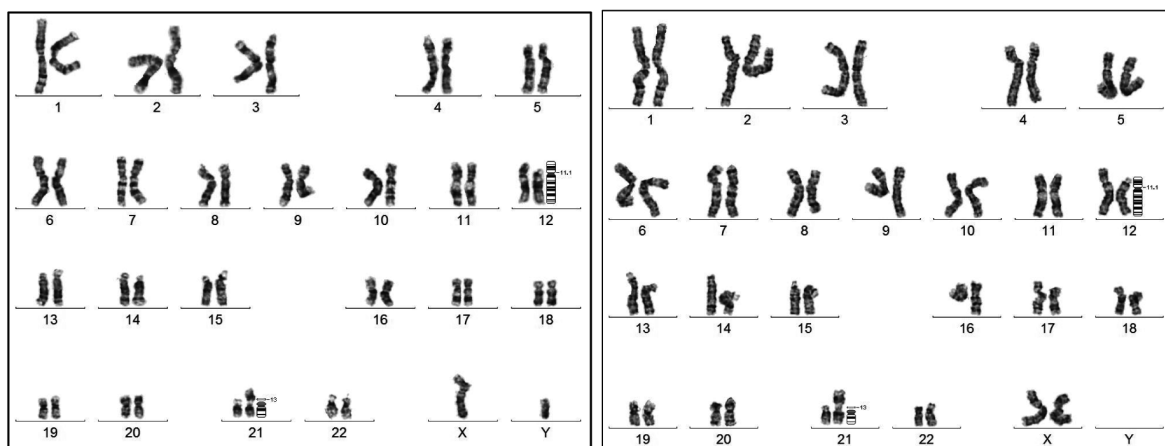
## МЕТОДИ І МЕТОДИКИ



**Диаграмма 1.** Показания, по которым проводилась инвазивная пренатальная диагностика среди пациенток с выявленной трисомией 21 плода.



**Диаграмма 2.** Величины индивидуальных рисков наличия трисомии 21 у плода по данным биохимического скрининга беременных среди подтвержденных случаев трисомии 21.



**Рис. 1.** Стандартный цитогенетический анализ образцов амниотической жидкости разнополрой двойни с наличием отцовской реципрокной транслокации между хромосомами 12 и 21, которая присутствует у обоих плодов.

составила 5,6% от всех исследованных образцов. Особенности кариотипа, которые считаются вариантами нормы [12], были диагностированы в 3,19% случаев, сбалансированные перестройки – 1,47%. Также среди аномалий кариотипа были выявлены трисомия 18, трисомия 13, наличие дополнительных маркерных хромосом, нарушение числа половых хромосом (полные и мозаичные формы), триплоидии [10]. Структура нарушений в группе аномальных кариотипов представлена в **таблице**.

Среди пациенток, кариотип плода которых имел трисомию 21, показанием к пренатальной диагностике в 38,09% случаях явился повышенный биохимический риск первого триместра, в 28,57% случаев – гипоплазия носовой косточки, в 19,05% показанием к исследованию стало увеличение шейной складки, 9,52% – повышенный риск при биохимическом скрининге второго триместра, 4,76% – наличие в семье ребенка с пороками развития (**диаграмма 1**).

После проведенного кариотипирования культур клеток амниотической жидкости и подтверждения трисомии по 21 хромосоме у плода были проанализированы величины индивидуальных рисков, при которых пациентки были направлены на инвазивную пренатальную диагностику. Самым высоким

оказался риск 1:2, а самый низкий – 1:117. Это означает, что среди 117 женщин с идентичными биохимическими маркерами у одной женщины плод может нести дополнительную хромосому 21. Как показывает **диаграмма 2**, среди всех подтвержденных трисомий 21 плода для 57,14% пациенток риск иметь плод с синдромом Дауна составлял от 1:2 до 1:10.

При исследовании нативной амниотической жидкости этих же пациенток количественные хромосомные патологии были выявлены в 100% случаев в течении 12-24 часов после проведения инвазивной процедуры. С помощью метода FISH в краткие сроки были установлены случаи трисомии 21, трисомии 18, моносомии X (полная и мозаичная формы), триплоидный набор хромосом, а также подтверждена сбалансированность хромосомного набора плодов при наличии хромосомной перестройки одного из родителей. Последний показатель очень важен, особенно в случаях, когда в хромосомных перестройках задействованы небольшие участки хромосом. Пример описанной ситуации представлен на **рисунках 1, 2, 3**.

Применение метода FISH незаменимо в случаях, когда невозможно получить результат стандартного цитогенетического исследования по причине

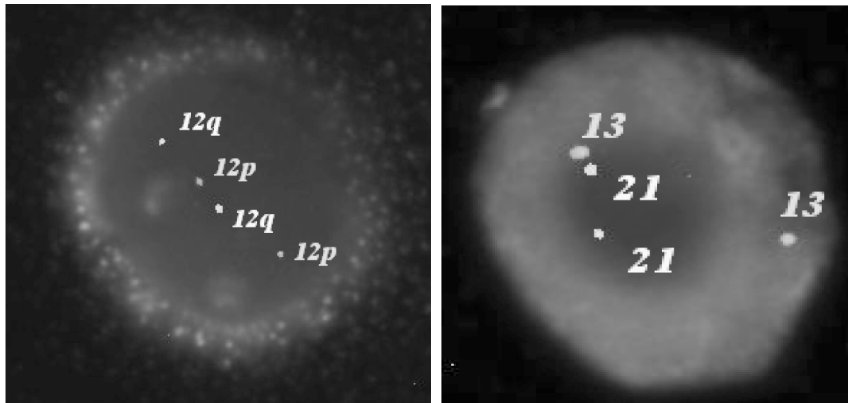


Рис. 2. Молекулярно-цитогенетический анализ (FISH) клеток амниотической жидкости. Демонстрация сигналов флуоресцентных меток хромосом 12 и 21, вовлеченных в хромосомную перестройку, и хромосомы 13.

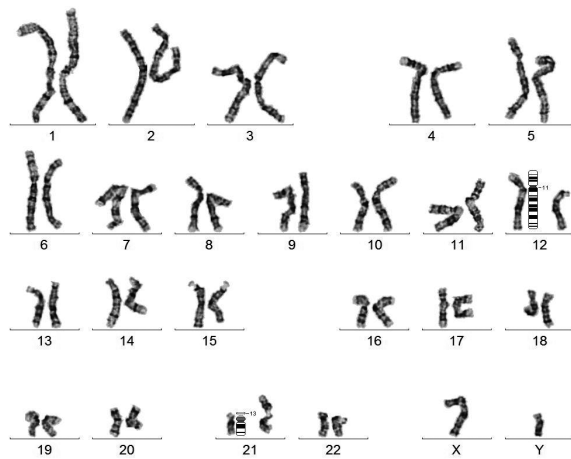


Рис. 3. Кариотип отца – носителя реципрокной транслокации между хромосомами 12 и 21 (стандартный цитогенетический анализ).

низкого митотического индекса культуры, а также отсутствие роста клеток из-за индивидуального невосприятости компонентов питательной среды, что встречается в 1-2% случаев [9]. В данном исследовании в 2,46% случаев не удалось проанализировать полный кариотип, но в то же время была проведена диагностика количественных показателей хромосом 13, 18, 21, X, Y FISH-методом и тем самым

было опровергнуто наличие синдромов, которые возникают при нарушении числа выше указанных хромосом.

**Выводы.** Пренатальная диагностика является важным этапом медико-генетического консультирования. Дополнение стандартного цитогенетического анализа проведением FISH-исследования имеет ряд преимуществ, так как с применением флуоресцентной *in situ* гибридизации результат может быть получен уже через 12 часов после инвазивной процедуры,

имеется возможность исследовать большее количество клеток, что помогает выявить даже низкоуровневый мозаицизм, и данная методика не требует большого объема образца. Исследование хромосом 13, 18, 21, X, Y объясняет 95% случаев спонтанных аборт и рождения детей с хромосомными патологиями [11]. В связи с этим совместное применение цитогенетического и молекулярно-цитогенетического исследования позволит улучшить результативность в профилактике хромосомной патологии, а также повысит информативность мероприятий, проводимых при ведении и сохранении беременности.

**Перспективы дальнейших исследований.**

Предупреждение рождения детей с хромосомной патологией – одна из важнейших задач современной медицины и генетики в частности. Кариотипирование семейной пары перед планированием беременности должно быть одним из обязательных этапов медико-генетического консультирования для выявления структурных особенностей в кариотипе, которые могут отобразиться на хромосомной сбалансированности половых клеток, а в дальнейшем и на хромосомном наборе эмбриона. Пациенты, которые войдут в группу риска, должны проходить дополнительный предимплантационный генетический скрининг эмбрионов (ПГС), являющийся наиболее эффективным методом профилактики хромосомной патологии плода.

**Литература**

1. Аборты и контрацепция в Украине. Стратегическая оценка политики, программ и исследований (отчёт и рекомендации) / Министерство здравоохранения Украины, Всемирная организация здравоохранения. – К., 2008. – С. 42.
2. Баранов В. С. Современные алгоритмы пренатальной диагностики наследственных болезней (методические указания) / В. С. Баранов, Т. В. Кузнецова. – С. Пб. : Н-Л., 2009. – С. 116.
3. Ворсанова С. Г. Медицинская цитогенетика / С. Г. Ворсанова, Ю. Б. Юров, В. Н. Чернышов. – М., 2006. – С. 219-222.
4. Зерова-Любимова Т. Е. Стандарты анализа препаратов хромосом человека (методические рекомендации) / Т. Е. Зерова-Любимова, Н. Г. Горовенко. – К., 2003. – С. 10, 16-18.
5. Зерова-Любимова Т. Е. Цитогенетические методы исследования хромосом человека (методические рекомендации) / Т. Е. Зерова-Любимова, Н. Г. Горовенко. – К., 2003. – С. 15-16.
6. Gosden J. R. Chromosome analysis protocols / John R. Gosden. – Totowa, NJ 07512 : Humana Press, 2010 – P. 449-478.
7. Harper J. C. Preimplantation genetic diagnosis / J. C. Harper. – Cambridge, Cambridge University Press, 2009 – P. 95-116.
8. Jacobs P. Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding / P. Jacobs, C. Browne // J. Med. Genet. – 1992. – Vol. 29. – P. 103-108.

9. McKinlay Gardner R. J. Chromosome abnormalities and genetic counseling / R. J. McKinlay Gardner, L. G. Shaffer, G. R. Sutherland. – New York : Oxford University Press, Inc., 2012. – P. 417-425.
10. Shaffer L. G. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature / L. G. Shaffer, J. McGowan-Jordan, M. Schmid. – Basel : Karger, 2013. – P. 140.
11. Shaffer L. G. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis / L. G. Shaffer, T. -H. Bui // Am. J. Med. Genet. – 2007. – Part C : Seminars in Medical Genetics. – P. 87-98.
12. Wayandt H. E. Human Chromosome Variation: Heteromorphism and Polymorphism / Herman E. Wayandt, Vijay S. Tonk. – New-York : Springer, 2013. – P. 140.

УДК 575. 155

### **ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ СТАНДАРТНОГО ЦИТОГЕНЕТИЧНОГО АНАЛІЗУ В ПОЄДНАННІ З ФЛУОРЕСЦЕНТНОЮ *IN SITU* ГІБРИДИЗАЦІЄЮ (FISH) У ПРЕНАТАЛЬНІЙ ДІАГНОСТИЦІ**

**Гонтар Ю. В., Ільїн І. Є., Федота А. М., Підченко Т. Ю.**

**Резюме.** У даній роботі відображена необхідність пренатальної діагностики, продемонстровані переваги поєднання різних підходів при виявленні маркерів хромосомної патології та визначенні хромосомного набору плода. Основним методом інвазивної процедури для отримання плодового матеріалу в дослідженні був амніоцентез. Найбільш частою хромосомною патологією була виявлена трисомія 21 (5,6%). Основними показаннями для проведення пренатальної діагностики цим пацієнтам були біохімічний скринінг (38,09%), гіпоплазія носової кістки (28,57%), збільшення комірцевого простору (19,05%) та інші. Серед встановлених рівнів ризиків за біохімічним скринінгом найвищим виявився ризик 1:2, найнижчим – 1:117. Таким чином, комплексний підхід у пренатальній діагностиці є найбільш інформативним і ефективним при виявленні та профілактиці генетично обумовлених патологій плода.

**Ключові слова:** трисомія 21, кариотип плода, амніоцентез, інвазивна пренатальна діагностика.

УДК 575. 155

### **АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ СОЧЕТАНИЯ СТАНДАРТНОГО ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ *IN SITU* ГИБРИДИЗАЦИИ (FISH) В ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ**

**Гонтар Ю. В., Ильин И. Е., Федота А. М., Пидченко Т. Ю.**

**Резюме.** Данная работа отображает преимущества сочетания цитогенетических и молекулярно-цитогенетических методов для определения хромосомного набора плода после выявления биохимических и УЗИ маркеров хромосомной патологии. Основным методом инвазивной процедуры для получения плодного материала в исследовании был амниоцентез. Наиболее частой хромосомной патологией была выявлена трисомия 21 (5,6%). Основными показаниями к пренатальной диагностике этим пациентам были биохимический скрининг (38,09%), гипоплазия носовой кости (28,57%), увеличение шейной складки (19,05%) и другие. Среди установленных уровней рисков по биохимическому скринингу самым высоким явился риск 1:2, самым низким – 1:117. Таким образом, комплексный подход в пренатальной диагностике является наиболее информативным и эффективным при выявлении и профилактике генетически обусловленных патологий плода.

**Ключевые слова:** трисомия 21, кариотип плода, амниоцентез, инвазивная пренатальная диагностика.

UDC 575. 155

### **Effectiveness of Standart Cytogenetic Analysis in Conjunction with Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) in Prenatal Diagnosis**

**Gontar J., Ilyin I., Fedota A., Pidchenko T.**

**Abstract.** The paper introduces the necessity of prenatal diagnosis, to demonstrate the benefits of combining different approaches for identifying markers of chromosomal aberrations and identification of chromosomes of the fetus. The main indications for prenatal diagnosis are the mother's age, the presence of hereditary diseases, burdened obstetric history (miscarriage), abnormalities in biochemical screening of pregnant woman's blood, deviation from the norm in the study of placental hemodynamics (Doppler), detection of developmental disorders of the fetus by ultrasound study in the first (indicators of nuchal translucency, size mismatch or absence of the nasal bone) and in the second trimester of pregnancy. To clarify and identify violations of fetal development in the prenatal diagnosis used invasive and non-invasive methods. The non-invasive methods include study of fetal cells that circulate in the mother's bloodstream, ultrasound in two-, three-, four-format, magnetic resonance imaging (MRI). Invasive techniques include biopsy of chorionic villi or placenta, amniocentesis, cordocentesis, fetal tissue research. First of all prenatal diagnosis aims to detect the most common chromosomal aberrations trisomy 21 or Down syndrome, which remains the greatest single autosomal trisomy with 1. 5 per 1,000 live births.

Primary data collection was held on the basis of cytogenetic laboratory of "Medical Center IGR" (director – Ilyin I., PhD) in the period from 2009 to 2013. In this study the main method of invasive procedures to obtain fetal material was amniocentesis. Aspiration of amniotic fluid was performed in a volume of 15-20 ml. After aspiration the fluid were cultured, fixed, and then produced a standard cytogenetic analysis. Native amniotic fluid was used for molecular cytogenetics by fluorescence in situ hybridization. In this case were counted 100 interphase nuclei of

## МЕТОДИ І МЕТОДИКИ

---

---

amniotic fluid cells with the registration of signals from chromosomes 13, 18, 21, X, Y. The study was based on data from 407 amniocentesis results of standard cytogenetic and molecular cytogenetic analysis.

The most common chromosomal abnormality was detected the trisomy 21 (5.6%). The main indications for prenatal diagnosis of these patients were biochemical screening (38.09%), nasal bone hypoplasia (28.57%), increased nuchal translucency (19.5%) and others. The highest risk by biochemical screening was 1:2, the lowest – 1:117.

In the investigation of native amniotic fluid of the same patients the quantitative chromosomal abnormalities were detected in 100% of cases within 12-24 hours after an invasive procedure. Using of FISH technique were established cases of trisomy 21, trisomy 18, monosomy X (full and mosaic forms), triploid set of chromosomes in the short term, and confirmed the balance of the chromosome set of fetuses in the presence of chromosomal rearrangement one of a parent. This determination is very important, especially in cases where chromosomal rearrangements involving small regions of different chromosomes. Application of FISH is indispensable in cases where it is impossible to get the result of the standard cytogenetic studies because of the low mitotic index of the cell culture, as well as the absence of cell growth due to the non-perception of the individual components of the nutrient medium, which occurs in 1-2% of cases.

So, the warning of children born with a chromosomal abnormality is one of the most important tasks of modern medicine and genetics in particular. Karyotyping of couples before planning pregnancy should be one of the essential steps in genetic counselling to identify structural peculiarities that may be displayed on the chromosomal balance of germ cells, and later on the chromosome set of the embryo. Patients who enter into the risk group should undergo additional preimplantation genetic screening of embryos (PGS), which is the most effective method to prevent the chromosomal abnormalities of the fetus. It is a comprehensive approach to pregnancy planning and correct counselling is a major challenge for the future investigations.

**Key words:** trisomy 21, karyotype of the fetus, amniocentesis, invasive prenatal diagnosis.

*Рецензент – проф. Траверсе Г. М.*

*Стаття надійшла 21. 08. 2014 р.*