

© Т. В. Кузнецова

НИИ акушерства и гинекологии
им. Д. О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

ПРЕНАТАЛЬНОЕ КАРИОТИПИРОВАНИЕ — МЕТОДЫ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

■ В обзоре кратко рассмотрены история и современные подходы к исследованию кариотипа человека, преимущества и недостатки цитогенетических и молекулярно-генетических методов хромосомного анализа. Даны основные понятия, используемые в пренатальном кариотипировании. Рассмотрены главные направления и итоги исследований спонтанных аборт, а также эмбрионального и плодного материала, полученного инвазивными методами пренатальной диагностики в I и II триместрах беременности. Охарактеризованы методические подходы к доимплантационной и неинвазивной пренатальной диагностике хромосомных болезней. Обсуждены перспективы развития методов пренатального кариотипирования.

■ **Ключевые слова:** пренатальная диагностика; хромосомные болезни; хромосомные аномалии; кариотипирование

Введение

Кариотипирование плода является неотъемлемой частью комплекса методов пренатальной диагностики (ПД). В подавляющем большинстве случаев (более 90 %) цитогенетические исследования плодного материала проводятся у беременных групп высокого риска по рождению ребенка с хромосомной патологией, сформированных по результатам программ пренатального скрининга (цитогенетического, биохимического и ультразвукового). Анализ кариотипа плода должен сопровождать любое инвазивное внутриматочное вмешательство, проводимое и по другим показаниям, так как геномные мутации возникают *de novo*, и каждая беременность может завершиться рождением ребенка с хромосомной болезнью.

В настоящее время проблема цитогенетической ПД практически решена. Разработаны надежные и эффективные методы получения препаратов и окраски хромосом из клеток плода и зародышевых оболочек на любом сроке беременности, а также у дробящихся зародышей до имплантации. Созданы стандарты кариотипирования, алгоритмы диагностики плацентарного мозаицизма и однородительской дисомии, идентификации хромосомных aberrаций. Разработаны подходы к анализу механизмов происхождения геномных и хромосомных мутаций и к проблеме изучения функций хромосом в эмбриогенезе человека.

Цель настоящего сообщения — на основании собственного 20-летнего опыта дать обзор современных представлений, касающихся стратегии и тактики цитогенетической диагностики, а также обсудить перспективные направления ПД хромосомных болезней.

Современные подходы к исследованию кариотипа

Термином «кариотип» принято обозначать совокупность морфологических особенностей полного хромосомного набора единичной клетки [16, 38]. Под кариотипированием обычно подразумевают анализ числа и структуры метафазных хромосом из клеток соматических тканей с помощью цитогенетических методов. Результатом кариотипирования является описание кариотипа в виде формулы с указанием общего числа хромосом и набора половых хромосом. Для обозначения численных и структурных хромосомных аномалий используются специальные знаки, символы и сокращения, рекомендованные международной цитогенетической номенклатурой хромосом человека [38].

Кариотипирование является обязательным компонентом постнатальной диагностики и ПД тех форм врожденной патологии, которые обусловлены аномалиями кариотипа, то есть хромосомных болезней. Аномалии кариотипа могут быть обусловлены изменениями как числа, так и структуры хромосом. Численные аномалии (геномные мутации), включающие полиплоидию (триплоидию, тетраплоидию) и анеуплоидию (трисомии, моносомии), возникают *de novo* в процессе гаметогенеза или в раннем эмбриогенезе. Различные структурные

перестройки хромосом (хромосомные аберрации) либо наследуются от родителей, либо возникают *de novo*. Нерасхождение хромосом в митотических делениях клеток может приводить к образованию мозаиков. Кариотипически различающиеся клетки могут быть представлены во всех тканях и органах (истинный, или генерализованный мозаицизм) или в какой-либо одной ткани, или органе (ограниченный мозаицизм).

Для анализа структуры и функции митотических и мейотических хромосом в клетках практически любых тканей и органов разработано множество методов. В практическом плане цитогенетические методы при всем разнообразии их отдельных этапов направлены на выявление геномных и хромосомных мутаций и анализ механизмов их происхождения. Выбор метода определяется конкретной целью исследования, однако в любом случае он состоит из двух этапов — получения хромосомных препаратов и собственно анализа.

Прямые методы пригодны для получения препаратов из соматических тканей, обладающих высокой митотической активностью (любые ткани эмбриона на ранних стадиях развития, хорион и плацента до 20-й недели беременности, костный мозг, лимфоидные узлы), а также для анализа мейотических хромосом. Непрямые методы включают способы получения препаратов хромосом после стимулирования пролиферации клеток в условиях *in vitro*. Культивирование необходимо для клеток из естественных суспензий (клетки амниотической жидкости, лимфоциты крови) и эксплантатов из любых органов и тканей. Продолжительность культивирования (несколько часов, дней, недель) определяется типом клеток, составом питательных сред, а также способом фиксации клеток.

Для идентификации хромосом и анализа их морфофункциональных особенностей используются различные методы дифференциальной окраски. Разнообразные способы предобработки препаратов позволяют выявлять как линейную неоднородность всех хромосом, то есть их G/R-блочную организацию, так и избирательно окрашивать отдельные хромосомные районы (прицентромерного гетерохроматина, ядрышковых организаторов). В зависимости от красителей анализ (общий и селективный анализ кариотипа или индивидуальных хромосом) проводится либо в проходящем свете, либо — после окрашивания флуорохромами — в отраженном свете с помощью люминесцентного микроскопа.

При стандартном кариотипировании исключается носительство всех геномных мутаций (анеуплоидий и полиплоидий) и многих хромосомных мутаций, особенно тех, которые изменяют морфологию хромосом, вовлеченных в перестройку.

Точность идентификации хромосомных аберраций зависит от разрешающей способности использованного метода и часто, особенно в спорадических случаях мелких перестроек и маркерных хромосом, представляет значительные трудности. Учитывая также статистические проблемы диагностики хромосомного мозаицизма, важно подчеркнуть, что точность стандартного пренатального кариотипирования не превышает 99 % [2, 18].

В настоящее время для хромосомного анализа адаптированы методы молекулярной генетики, ранее предназначавшиеся исключительно для работы с изолированной ДНК.

К методам молекулярного кариотипирования можно отнести различные варианты неизотопной гибридизации *in situ* (FISH) с хромосом- и локус-специфичными ДНК-зондами, методы спектрального кариотипирования (SKY) и сравнительной геномной гибридизации (CGH, array-CGH), рестрикции и ник-трансляции *in situ* и другие. Использование этих методов позволяет проводить как общий, так и селективный анализ кариотипа и индивидуальных хромосом, идентифицировать численные и структурные аномалии, они незаменимы для диагностики микрохромосомных перестроек и установления природы маркерных хромосом. Подробно с методами молекулярного кариотипирования можно ознакомиться в серии работ проф. Н. Б. Рубцова и его сотрудников из НИИ цитологии и генетики СО РАН [21, 22] и зарубежных авторов [40].

Для снижения трудоемкости кариотипирования, а также для анализа и объективизации результатов, полученных с помощью методов молекулярной цитогенетики, разработаны автоматические системы анализа изображений с соответствующим программным обеспечением.

Таким образом, современная цитогенетика располагает широким спектром методических подходов к анализу структуры и функции хромосом.

Краткий экскурс в историю цитогенетики

Столь бурным прогрессом цитогенетика человека обязана в первую очередь цитогенетикам Н. J. Tjio и A. Levan, которые в 1956 году, апробируя методы культивирования тканей млекопитающих, обнаружили, что нормальный кариотип человека в фибробластах легкого от трех медицинских абортусов содержит 46 хромосом. Подтверждение этого факта в клетках сперматогенного ряда английскими цитологами С. Е. Ford и J. L. Hamerton стимулировало развитие клинической цитогенетики. В качестве материала для первых исследований кариотипа у пациентов с синдромами Дауна, Шерешевского–Тернера, Клайнфельтера были использованы культуры

фибробластов кожи и костного мозга. После разработки в 1960 году P. S. Moorhead и соавторами методики приготовления препаратов хромосом из ФГА-стимулированных лимфоцитов крови, метод стал основным для анализа хромосом человека в постнатальном онтогенезе. В начале 1970-х годов существенный вклад в развитие цитогенетики человека внесли методы дифференциальной окраски, позволившие идентифицировать каждую хромосому в нормальном кариотипе и выявлять структурные перестройки хромосом. Подробнее с историческими вехами цитогенетики человека можно ознакомиться в книгах [16, 23, 34, 37]. Последние два десятилетия ознаменованы внедрением методов молекулярной генетики и компьютерных технологий.

Изучение хромосом у эмбрионов и плодов человека, представляющее особый интерес с точки зрения цитогенетики развития, формировалось в трех направлениях: анализ материала спонтанных абортусов, пренатальная диагностика хромосомных болезней в разные сроки беременности и доимплантационная диагностика геномных и хромосомных мутаций. Акцентируя внимание на методологических аспектах, кратко рассмотрим основные достижения и проблемы в этих областях исследований.

Исследование спонтанных абортусов

60–70-е годы XX века ознаменованы крупномасштабными исследованиями спонтанных абортусов человека, в результате которых был установлен весомый вклад аномалий кариотипа в репродуктивные потери, особенно в ранние сроки беременности. Патоморфологическому и цитогенетическому анализу были подвергнуты тысячи эмбрионов и зародышевых оболочек, у ~70 % из которых были выявлены хромосомные или геномные мутации. Было показано, что хромосомный дисбаланс приводит к различным по характеру и выраженности изменениям (бласто-, эмбрио- и фетопатиям), которые проявляются на клеточном, тканевом и организменном уровнях [10]. Эти исследования сыграли важную роль в понимании специфичности и неспецифичности пороков развития, в формировании представлений о клеточном синдроме как патоморфологической основе хромосомных болезней [5, 10, 11]. Обнаружение мозаичных анеуплоидий в культурах клеток плодных оболочек спонтанных абортусов позволило высказать предположение о существовании ограниченного плацентарного мозаицизма [54], которое к настоящему времени доказано многочисленными результатами ПД.

Вместе с тем, исследования спонтанных абортусов показали ограниченные возможности тради-

ционного цитогенетического анализа, обусловленные трудностями культивирования клеток из тканей абортусов, подвергшихся аутолизу [10], или отсутствием спонтанных митозов в цитотрофобласте (собственные наблюдения). Получение информации о кариотипе зародыша даже в культурах клеток с очень низкой пролиферативной активностью стало возможным только при использовании современных высокотехнологичных методов — FISH с различными ДНК-пробами и CGH [12, 17, 22, 40]. Эти исследования позволили уточнить спектр численных хромосомных аномалий и выявить структурные перестройки хромосом, не зарегистрированные традиционными методами.

Цитогенетический анализ постабортного материала актуален и в настоящее время. С практической точки зрения он служит целям диагностики при неразвивающейся беременности и установления причин невынашивания [24]. С другой стороны, продолжение комплексных исследований эмбрионов и плодных оболочек способствует накоплению сведений о фенотипических проявлениях хромосомного дисбаланса [7, 14] и является источником уникальной информации о функциях хромосом в эмбриогенезе [2].

Пренатальная диагностика хромосомных болезней

В зависимости от срока беременности материалом для хромосомного анализа могут служить хорион и плацента, клетки амниотической жидкости и лимфоциты пуповинной крови плода, полученные соответствующими инвазивными способами. Кариотипирование плода требует применения комплекса методов, который включает разнообразные способы приготовления и окрашивания препаратов хромосом, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Подробно они рассмотрены нами в монографиях [2, 18]. Отметим кратко наиболее существенные моменты, связанные с развитием методов пренатального кариотипирования и особенностями исследования материала различного эмбрионального происхождения.

Первые попытки прижизненного анализа кариотипа плода по клеткам амниотической жидкости и ворсинчатого хориона были предприняты для определения пола плода по половому хроматину [43]. Однако этот подход, предоставляющий зачастую неоднозначную информацию о системе половых хромосом в некультивированных клетках, не получил признания, а массовая селекция эмбрионов женского пола в Китае [31] привела ВОЗ к ограничению рекомендаций по пренатальному определению пола плода X-сцепленными болезнями, не доступными для молекулярной диагностики [47].

В середине 1960-х годов было обнаружено, что часть клеток амниотической жидкости, имеющих эмбриональное происхождение, способна к пролиферации и образованию колоний в условиях *in vitro* [51]. Количество жизнеспособных клеток в 20–50 мл (10–15 % общего объема) околоплодных вод оказалось вполне достаточным для успешного культивирования. Амниоцентез в 15–17 недель беременности, благодаря своей относительной безопасности, завоевал первенство среди методов получения плодного материала с целью кариотипирования плода за рубежом. С повышением разрешающей способности ультразвуковых аппаратов появились возможности проведения амниоцентеза в 9–14 недель беременности [3, 35]. Небольшой общий объем околоплодных вод и малочисленность жизнеспособных клеток амниотической жидкости в I триместре стимулировали разработку метода амниофильтрации, при котором жидкость возвращается в амниотическую полость после извлечения клеток из образца [32]. Однако невысокая результативность цитогенетической диагностики и относительно высокий риск негативных последствий раннего амниоцентеза ограничивают возможности применения этих подходов.

Для стандартного культивирования амниоцитов требуется 2–3 недели (максимальный срок анализа 21 день) [15]. Применение специальных питательных сред несколько сокращает длительность культивирования. Принципиально новый метод, основанный на микроманипуляционной изоляции единичных метафазных клеток из первичных и перевиваемых культур [4, 48], позволяет сократить период культивирования до нескольких дней и, что особенно существенно, снизить риск диагностических ошибок, обусловленных как мозаицизмом, так и контаминацией образца. Однако, этот прогрессивный метод не нашел практического применения, так как требует наличия специального оборудования и навыков.

С целью сокращения времени, необходимого для анализа, возможно использование некультивированных амниоцитов с помощью метода FISH. Этот продуктивный метод, позволяющий за 1–2 дня получить информацию о копийности отдельных локусов хромосом в интерфазном ядре, широко использовался в 1990-е годы за рубежом для экспресс-диагностики наиболее распространенных анеуплоидий [49]. Следует отметить, однако, что полученная с помощью этого метода информация является ориентировочной и неофициальной. Для формулировки заключения о кариотипе плода требовались результаты традиционного кариотипирования по культивированным амниоцитам. В нашей практике препараты некультивированных амниоцитов используются с целью получения де-

тальной информации о кариотипе плода методом FISH при верификации гетероплоидии, установленной по клеткам другого происхождения (хорион/плацента, лимфоциты пуповинной крови).

Использование амниоцитов для диагностики хромосомных болезней в нашей стране, в отличие от зарубежных центров, не пользуется популярностью. Основным фактором, сдерживающим внедрение амниоцентеза в России, является отсутствие финансирования для закупки дорогостоящего оборудования и расходных материалов для культивирования клеток амниотической жидкости. Следует отметить также, что согласно международным стандартам [15] результативность анализа по амниоцитам, связанная с техническими и культуральными неудачами, не превышает 98 %.

Первые манипуляции по получению образцов хориона, которые осуществлялись трансцервикально с использованием биопсийных щипцов [3, 20] или катетера [33], сопровождались осложнениями, что сдерживало их внедрение. Одним из ведущих методов получения образцов хориона и плаценты стала трансабдоминальная аспирационная биопсия [26], имеющая несомненные преимущества (минимальный перечень противопоказаний для манипуляции и низкая частота послеоперационных осложнений, высокая эффективность получения материала и возможность использования в любой срок беременности).

Внедрению хорионбиопсии способствовало также усовершенствование цитогенетических методов, в первую очередь, «прямых» методов приготовления препаратов из образцов хориона. Впервые препараты из ворсинчатого хориона, содержащие метафазные пластинки удовлетворительного качества без использования культуры клеток, были получены группой миланских исследователей [50]. В последующие годы были предложены различные модификации, которые затрагивают все этапы обработки ворсин и способы нанесения образца на препарат. Однако типичными недостатками прямого метода остаются низкое количество и качество метафазных пластинок и малая пригодность хромосом для стандартной дифференциальной окраски красителем Гимза. По сложившимся традициям врачи-цитогенетики во всем мире предпочитают окрашивание хромосом красителем Гимза. Люминесцентные методы (окраска акрихином) используются лишь в отдельных центрах, возглавляемых авторитетными специалистами в области ПД, — А. Boe (частный центр, Париж) и М. Mikkelsen (Институт Кеннеди, Копенгаген) (собственные наблюдения). Как показывает наш опыт, использование нуклеотид-специфичных флуорохромов в сочетании с контрастирующими агентами не

только существенно повышает разрешающую способность и эффективность цитогенетического анализа, но и позволяет получать стабильную и воспроизводимую дифференциальную окраску хромосом на «прямых» препаратах, что имеет принципиальное значение для ПД. Разработанные нами методы приготовления препаратов из цитотрофобласта позволяют провести традиционный анализ окрашенных флуорохромом Hoechst 33258 хромосом и при необходимости выдать заключение о кариотипе в день получения материала. Ускоренный прямой метод приготовления препаратов из хориона и плаценты [1] используется в нашем центре как основной в сроки 9,5–19 недель беременности. В сочетании с флуоресцентными методами дифференциальной окраски хромосом его результативность на 7809 образцах достигла 99,8 %, что превышает международные стандарты технических неудач цитогенетического анализа хориона (98,5 %) [15].

Одним из недостатков кариотипирования по клеткам цитотрофобласта является относительно высокий риск диагностических ошибок, обусловленных хромосомным мозаицизмом, ограниченным плацентой. Суммарная частота возможных типов плацентарного мозаицизма составляет 2 % от всех прогрессирующих беременностей [39]. Считается, что прогностическая значимость результатов кариотипирования при использовании в качестве материала клеток любых плодных оболочек, учитывая внезародышевое происхождение хориона и раннюю дифференцировку амниона, оказывается сниженной по сравнению с анализом лимфоцитов пуповинной крови плода, имеющих исключительно эмбриональное происхождение. Поэтому для хромосомного анализа по клеткам хориона или плаценты в настоящее время рекомендовано использование двух методов получения хромосомных препаратов — «прямого», основанного на фиксации спонтанно делящихся клеток цитотрофобласта, и длительного культивирования клеток мезенхимальной стромы ворсин [30]. Следует отметить, однако, что культуры клеток хориона характеризуются теми же недостатками, что и культуры амниоцитов (длительность, культуральные неудачи, риск ошибок вследствие контаминации образца материнскими клетками, псевдомозаицизм и др.) [15]. Проблемы и алгоритмы диагностики плацентарного мозаицизма детально рассмотрены нами ранее [2, 9, 18]. Сведения о частоте и спектре хромосомных аномалий, полученные нами почти на 8000 образцов хориона и плаценты, показывают, что диагностическая ценность кариотипирования с использованием только «прямых» препаратов вполне сопоставима с таковой, зарегистрированной в соответствующие хро-

ки беременности в зарубежных центрах по культурам амниоцитов и клеток хориона [8, 19, 45]. При этом частота плацентарного мозаицизма, установленная при верификации диагноза по эмбриональным клеткам после прерывания беременности и по лимфоцитам плода, полученным при кордоцентезе, составила 1 % [8, 45].

Для кариотипирования по лимфоцитам применяют стандартную методику стимулирования клеток к делению с помощью митогенов, наиболее распространенным из которых является фитогемагглютинин (ФГА). Проблема исследования крови плода в рамках ПД была практически решена благодаря разработке методик пункции пуповины под ультразвуковым контролем, начиная с 18–19-й недели беременности [13, 28]. Успешность цитогенетической диагностики по лимфоцитам пуповинной крови в нашей работе (1604 образца) составила 99,9 %, что превышает международные стандарты для периферической крови (5 % технических и 5 % культуральных неудач) [15]. Единичные случаи культуральных неудач были обусловлены гемолизом эритроцитов в образцах, полученных от плодов с тяжелой формой гемолитической болезни.

Таким образом, кариотипирование плода на различных стадиях внутриутробного развития требует применения комплекса методов, который включает разнообразные способы приготовления и окрашивания препаратов хромосом, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Следует подчеркнуть, что эффективность диагностики зависит от качества и количества плодного материала, а ее точность определяется разрешающей способностью методов анализа, выбор которых диктуется показаниями к ПД и сроком беременности. Перед проведением инвазивного вмешательства необходимо оценить адекватность получаемого плодного материала конкретным целям исследования.

В последние годы разработана и уже широко применяется за рубежом молекулярная диагностика наиболее частых анеуплоидий, таких как трисомия 21 (синдром Дауна), трисомия 13 (синдром Патау), трисомия 18 (синдром Эдвардса), моносомия X (синдром Шерешевского–Тернера), другие нарушения числа половых хромосом. На долю этих анеуплоидий приходится более 90 % аномалий кариотипа, совместимых с живорождением и приводящих к хромосомным болезням. Принцип метода флуоресцентной количественной ПЦР (Quantitative Fluorescent PCR — QF-PCR) заключается в одновременной амплификации небольших полиморфных фрагментов ДНК, расположенных на каждой из хромосом. Благодаря использованию в реакции ПЦР специальных флуорохромов, каждый из продуктов амплификации легко дискриминируется, а применение специального сканера поз-

воляет точно определить дозу амплифицированной ДНК каждого фрагмента отдельной хромосомы. Наличие тройной дозы какого-либо фрагмента доказывает трисомию соответствующей хромосомы, двойной дозы — нормальный диплоидный набор, а одинарной — моносомию. Быстрота анализа (24–27 часов), эффективность, достигающая 98 %, практическое отсутствие ложноположительных или ложноотрицательных результатов, огромная пропускная способность (одновременное сканирование 300–3000 образцов ДНК из амниоцитов, хориона или плаценты) открывают большие перспективы перед этим методом, уже получившим название «тест быстрого скрининга анеуплоидии» [52]. Важно подчеркнуть, что этот экспресс-тест, позволяющий выявлять полные и мозаичные формы конкретных анеуплоидий, относится к разряду методов селективного анализа индивидуальных хромосом и уступает по разрешающей способности традиционному кариотипированию, которое предоставляет информацию о числе и структуре всего хромосомного набора.

Доимплантационная диагностика геномных и хромосомных мутаций

Доимплантационная диагностика появилась в 1990-х годах благодаря быстрому развитию методов вспомогательной репродукции и микрометодов, приемлемых для анализа генома единичных клеток, таких как методы молекулярной цитогенетики (различные варианты FISH) и молекулярной генетики (варианты ПЦР). В настоящее время список наследственных болезней, доступных для диагностики на доимплантационных стадиях, включает не только многие моногенные (муковисцидоз, фенилкетонурию), но и различные хромосомные болезни. К сожалению, в центрах вспомогательных репродуктивных технологий Москвы, Санкт-Петербурга и Красноярска диагностика зачастую проводится только с целью определения пола эмбриона.

В зависимости от материала исследования доимплантационную диагностику можно подразделить на преконцепционную (анализ полярных телец) и собственно доимплантационную (анализ бластомеров).

Проблема цитогенетического анализа полярных телец заключается в невозможности применения традиционных методов анализа метафазных хромосом. Поэтому для этих целей обычно используют метод FISH с ДНК-зондами, специфичными к участкам отдельных хромосом. В последние годы разработаны и апробированы методы, пригодные для стандартного цитогенетического анализа хромосом из полярных телец. Предложенные модификации уже позволили провести анализ хромосомного набора в полярных тельцах с эффективностью 94,1 % [44, 53].

Биопсия 1–2 бластомеров осуществляется на стадии 8–10 клеток. Методически анализ единичных бластомеров от дробящихся зародышей принципиально не отличается от анализа полярных телец, проводится методом FISH с использованием ДНК-зондов, специфичных к прицентромерным или теломерным районам хромосом 13, 16, 18, 21, X, Y, и позволяет получить информацию о числе маркированных участков в исследованных бластомерах. При гетерозиготном носительстве транслокации одним из родителей для диагностики методом FISH используются соответствующие цельнохромосомные и локус-специфичные ДНК-зонды.

Проблема диагностики численных аномалий кариотипа осложняется высокой частотой хромосомного мозаицизма на ранних стадиях эмбриогенеза человека. Доимплантационная диагностика на этой стадии может быть рекомендована только в группах высокого риска рождения ребенка с наследственной патологией.

Более надежная доимплантационная диагностика может быть проведена на стадии бластоцисты. На этой стадии зародыш состоит примерно из 60–100 клеток. При визуализации трофобласта и эмбриобласта без ущерба для развития эмбриона можно удалить до 10 клеток трофобласта. Следует, однако, учитывать, что культивирование эмбрионов *in vitro* редко доводят до стадии бластоцисты, так как способность к имплантации таких эмбрионов оказывается сниженной.

Таким образом, основное (и зачастую, единственное) преимущество диагностики до имплантации заключается в возможности трансплантации генетически полноценных эмбрионов. Недостатками этого подхода являются методические трудности, связанные с необходимостью работы с микроколичествами материала, ограничения диагностики рамками программ вспомогательных репродуктивных технологий и большая вероятность ошибочной диагностики. Более детально с методами, возможностями и ограничениями ПД в доимплантационный период можно ознакомиться в соответствующих руководствах и монографиях [29, 52].

Нетрадиционные методы получения и анализа плодного материала

Любое хирургическое вмешательство с целью получения плодного материала неизбежно сопряжено с риском осложнений. Так, удаление бластомеров при доимплантационной диагностике может вызвать замедление темпов дробления и остановку развития эмбриона на ранних стадиях. Инвазивное вмешательство с целью получения ворсинок хориона или плаценты, околоплодных вод или крови из пуповины может привести к гибели плода и спонтанному прерыванию бере-

менности. Поэтому разработка неинвазивных методов ПД, позволяющих избежать любых осложнений, представляется вполне оправданной.

Еще в 1893 году было показано, что клетки трофобласта зародыша человека могут мигрировать из плаценты в маточную вену, флотировать в кровяном русле матери и депонироваться в различных органах материнского организма. Столетие спустя, они были обнаружены и в цервикальном канале матки [25].

Для получения трансцервикальных образцов в 6–15 недель беременности предложено несколько способов — соскобы и смывы со стенок канала, аспирация цервикальной слизи [25]. В зависимости от способа получения образцы в большей или меньшей мере контаминированы клетками материнских тканей, при этом эмбриональные клетки, представленные клеточными элементами плацентарных тканей, составляют около 30–50 % [27]. Для исследования используется комплексный подход, включающий FISH с прицентромерными ДНК-зондами на нативных и культивированных клетках. Клетки после кратковременного культивирования пригодны также для кариотипирования [25].

Использование трансцервикальных образцов не нашло широкого применения в клинической практике. В основном, это обусловлено методическими трудностями работы с заведомо контаминированными образцами, что резко снижает диагностическую ценность этого подхода. Несмотря на то, что некоторыми исследователями продемонстрирована высокая эффективность получения материала и его анализа для определения пола плода и распространенных анеуплоидий [25], другие авторы получили результат лишь в 44 % случаев [41]. Кроме того, до сих пор не определен риск осложнений после получения плодного материала, что имеет принципиальное значение для внедрения метода в медицинскую практику.

В последние годы предприняты усилия по разработке методов ПД с использованием клеток плода, выделенных из крови матери. Вопрос о динамике количества клеток плода, циркулирующих в крови беременной на разных сроках беременности, а также их сохранности в организме матери после родоразрешения или прерывания беременности до сих пор остается дискуссионным.

Состав клеток плода в кровяном русле матери варьирует и представлен как элементами крови плода, в том числе ядерными эритроцитами, так и клетками плаценты [6, 29]. Для обогащения образца клетками плодного происхождения необходима клеточная сортировка [6]. Для анализа плодных клеток, выделенных из кровяного русла матери, как правило, применяются высокотехнологичные методы молекулярной генетики

и цитогенетики. На них уже продемонстрированы возможности диагностики пола плода и распространенных анеуплоидий [6, 42].

Исследование клеток плода в крови матери на практике может быть использовано не столько для диагностических целей, сколько с целью формирования групп высокого риска рождения больного ребенка. Однако их применение в режиме скрининга недоступно по причине высокой стоимости. В то же время, методы, основанные на анализе плодного материала, представленного в крови матери, в некоторых случаях могут оказаться единственно возможным методом диагностики, например, при состояниях угрожающего выкидыша и др.

Интересным и многообещающим кажется предложенный недавно подход, основанный на анализе внеклеточной ДНК плода в крови матери [46]. Предполагают, что ДНК вследствие деградации клеток плода попадает в плазму материнской крови, где может быть обнаружена при помощи ПЦР. В настоящее время успешная диагностика резус-принадлежности и пола плода по фетальной ДНК в крови матери уже проводится в многочисленных центрах [36, 46].

Очевидно, что диагностика по клеткам и ДНК-плода в крови матери, равно как и доимплантационная диагностика, не смогут стать альтернативой стандартной инвазивной диагностике в I и II триместрах беременности. Именно благодаря высокой точности и минимальной опасности для матери и плода, инвазивные методы ПД завоевали столь широкую популярность во всем мире. Совершенствование этих стандартных подходов в сочетании с повышением разрешающей способности молекулярных и цитогенетических методов исследования можно рассматривать как реальную перспективу развития ПД в XXI веке.

Заключение

Все достижения в пренатальном кариотипировании оказались возможными благодаря совершенствованию ультразвуковой и микроскопической техники, разработкам и внедрению в медицинскую практику эффективных цитогенетических и молекулярных методов анализа плодного материала. Современные цитогенетические методы исследования, дополненные при необходимости анализом ДНК, позволяют выявлять любые геномные и хромосомные мутации на разных этапах онтогенеза человека и достаточно точно устанавливать механизмы их возникновения. Каждый из рассмотренных подходов имеет свои преимущества и ограничения. Наиболее перспективным для цитогенетики развития человека является комплексный подход, основанный на сопоставлении ре-

зультатов патоморфологических, цитологических и молекулярных исследований с данными цитогенетического анализа. Прогресс способов получения эмбрионального и плодного материала для прижизненных исследований в сочетании с безусловными достижениями молекулярной цитогенетики предоставляет такую уникальную возможность.

Литература

1. Баранов В. С. Метод стряхивания-отпечатывания — простой и надежный способ приготовления прямых хромосомных препаратов из хориона / Баранов В. С. // Цитология. — 1989. — Т. 31, № 2. — С. 251–253.
2. Баранов В. С. Цитогенетика эмбрионального развития человека: научно-практические аспекты / Баранов В. С., Кузнецова Т. В. — СПб: Изд-во Н-Л, 2007. — 640 с.
3. Бахарев В. А. Пренатальная диагностика хромосомных болезней / Бахарев В. А., Доронина О. А., Каретникова Н. А. // Принципы организации и методические основы профилактики инвалидизирующих наследственных болезней: сборник материалов республиканского совещания. 24–26 апреля 1996 года. — М., 1996. — С. 19–22.
4. Быстрое кариотипирование клеток млекопитающих / Рубцов Н. В. [и др.] // Генетика. — 1994. — Т. 30, № 1. — С. 66–71.
5. Гринберг К. Н. Цитологические проявления хромосомного дисбаланса / Гринберг К. Н. // Прогресс в медицинской генетике / Под ред. Н. П. Бочкова. — М.: Медицина, 1978. — С. 151–186.
6. Золотухина Т. В. Клетки плода в крови матери: новый неинвазивный метод в пренатальной диагностике наследственных болезней / Золотухина Т. В., Шилова Н. В. // Вестн. РАМН. — 1999. — № 12. — С. 45–48.
7. Кириллова И. А. Патологическая анатомия и патогенез пороков развития в пренатальном онтогенезе человека: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — СПб., 1994. — 42 с.
8. Кузнецова Т. В. Комплексный подход к цитогенетике эмбрионального развития человека: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — СПб., 2000. — 38 с.
9. Кузнецова Т. В. Ограниченный плацентарный мозаицизм: биологические и медицинские аспекты / Кузнецова Т. В., Гагарина А. В., Баранов В. С. // Пренат. диагн. — 2002. — Т. 1, № 2. — С. 141–153.
10. Кулиев А. М. Фенотипические аспекты хромосомных эмбриолеталей человека: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1976. — 48 с.
11. Кухаренко В. И. Клеточные и биохимические аспекты эмбриопатий человека с аномальным набором хромосом: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1995. — 47 с.
12. Лебедев И. Н. Особенности фенотипической экспрессии аутосомных моносомий при патологии постимплантационного развития человека / Лебедев И. Н., Назаренко С. А. // Онтогенез. — 2004. — Т. 35, № 1. — С. 53–60.
13. Михайлов А. В. Внутриматочные вмешательства под ультразвуковым контролем во время беременности / Михайлов А. В. // Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике / Под ред. В. В. Митькова, М. В. Медведева. — М.: Видар, 1996. — Т. 2. — С. 280–302.
14. Морфологическое исследование сердца у плодов с хромосомными болезнями, абортрованными после пренатальной диагностики в I триместре беременности / Новикова И. В. [и др.] // Пренат. диагн. — 2004. — Т. 3, № 3. — С. 197–202.
15. Назаренко С. А. Тест-система внешнего контроля качества цитогенетических исследований в учреждениях медико-генетической службы: пос. для врачей / Назаренко С. А., Васильева Е. О. — Томск: Печатная мануфактура, 2003. — 34 с.
16. Основы цитогенетики человека / Ред. Прокофьева-Бельговская А. А. — М.: Медицина, 1969. — 544 с.
17. Островерхова Н. В. Детекция анеуплоидии у спонтанных абортусов методом сравнительной геномной гибридизации / Островерхова Н. В., Назаренко С. А., Лебедев И. Н. // Генетика. — 2002. — Т. 38, № 12. — С. 1690–1698.
18. Пренатальная диагностика наследственных и врожденных болезней / Ред. Э. К. Айламазян, В. С. Баранов. — М.: МЕДпресс-информ, 2006. — 416 с.
19. Пренатальная диагностика хромосомных болезней у плода: десятилетний опыт / Кузнецова Т. В. [и др.] // Вестн. Рос. ассоц. акуш.-гин. — 1997. — № 3. — С. 94–99.
20. Розовский В. С. Определение пола плода в первом триместре беременности / Розовский В. С., Кази З., Бахарев В. А. // Акуш. и гин. — 1980. — № 8. — С. 35–37.
21. Рубцов Н. Б. Анализ маркерных хромосом: ДНК-пробы для оценки возможного клинического значения маркерных хромосом / Рубцов Н. В., Карамышева Т. В., Гайнер Т. А., Шкляева О. А. // Мед. генет. — 2003. — Т. 2, № 12. — С. 520–527.
22. Рубцов Н. Б. Современные методы молекулярно-цитогенетического анализа и диагностика хромосомной патологии / Рубцов Н. Б., Карамышева Т. В., Гайнер Т. А. // Геномика — медицине. — М.: Академкнига, 2005. — С. 219–244.
23. Фогель Ф. Генетика человека: В 3-х т. Т. 1: пер. с англ. / Фогель Ф., Мотульски А. — М.: Мир, 1989. — 312 с.
24. Харченко Т. В. Цитогенетические аспекты невынашивания беременности и эмбриональных потерь при вспомогательных репродуктивных технологиях / Харченко Т. В., Ильин А. Б., Абашин В. Г. // Ж. акуш. жен. болезн. — 2003. — Т. LII, Вып. 1. — С. 72–78.
25. Adinolfi M. First trimester prenatal diagnosis using transcervical cells: an evaluation / Adinolfi M., Sherlock J. // Hum. Reprod. Update. — 1997. — Vol. 3, N 4. — P. 383–392.
26. Brambati B. Methods of chorion villi sampling / Brambati B., Oldrini A. // Chorion villus sampling / Ed. B. Brambati. — N.-Y.: Livingstone, 1986. — P. 73–97.
27. Bulmer J. N. Immunohistochemical characterization of cells retrieved by transcervical sampling in early pregnancy / Bulmer J. N., Rodeck C., Adinolfi M. // Prenat. Diagn. — 1995. — Vol. 15, N 12. — P. 1143–1153.
28. Daffos F. Fetal blood sampling via the umbilical cord using a needle guided by ultrasound. Report of 66 cases / Daffos F., Capella-Pavlovsky M., Forestier F. // Prenat. Diagn. — 1983. — Vol. 3, N 4. — P. 271–277.

29. Early Prenatal Diagnosis, Fetal Cells and DNA in the Mother. Present State and Perspectives / Eds. Macek M., Bianchi D. W., Cuckle H. — Prague: The Karolinum Press, 2002. — 426 p.
30. E. C. A. Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance // E. C. A. Newsletter. — 2006. — N 17. — P. 15–32.
31. Fetal sex prediction by sex chromatin of chorion villi cells during pregnancy // Chin. Med. J. — 1975. — Vol. 1, N 2. — P. 117–126.
32. First trimester amniocentesis: technical, cytogenetic and pregnancy outcome of 104 consecutive procedures / Burne D. L. [et al.] // Br. J. Obstetr. Gynecol. — 1995. — Vol. 102. — P. 220–223.
33. First trimester fetal diagnosis of genetic disorders: clinical evaluation of 250 cases / Brambati B. [et al.] // J. Med. Genet. — 1985. — Vol. 22, N 2. — P. 92–99.
34. Harper P. S. First years of Human Chromosomes. The beginnings of Human Cytogenetics / Harper P. S. — N.-Y.: Scion Publishing Ltd, 2006. — 182 p.
35. Holzgreve W. Prenatal karyotyping: when, whom and how? / Holzgreve W., Terzanli S., Schneider H. P. G., Miny P. // Ultrasound Obstetr. Gynecol. — 1992. — Vol. 2, N 1. — P. 64–69.
36. Holzgreve W. Enrichment of fetal cells and free fetal DNA from maternal blood: An insight into the Basel experience / Holzgreve W., Zhong X. Y., Burk M. R., Hahn S. // Early Pregnancy. — 2001. — Vol. 5, N 1. — P. 43–44.
37. Hsu T. C. Human and mammalian cytogenetics / Hsu T. C. — N.-Y.: Springer-Verlag, 1979. — 186 p.
38. ISCN — an international system for human cytogenetic nomenclature / Ed. Miteman F. — Basel: Karger, 2005. — 114 p.
39. Kalousek D. K. Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions / Kalousek D. K., Dill F. J. // Science. — 1983. — Vol. 221, N 4611. — P. 665–667.
40. Molecular karyotyping: towards improved pre- and postnatal diagnosis / Vermeesch J. R. [et al.] // E. C. A. Newsletter — 2005. — N 15. — P. 9–15.
41. Non-invasive early prenatal molecular diagnosis using retrieved transcervical trophoblast cells / Massari A., Novelli G., Colosimo A. [et al.] // Hum. Genet. — 1996. — Vol. 97, N 2. — P. 150–155.
42. Non-invasive exclusion of fetal aneuploidy in an at-risk couple with a balanced translocation / Wang J. Y., Zhen D. K., Zilberstein M. E. [et al.] // Mol. Hum. Reprod. — 2000. — Vol. 6, N 2. — P. 103–106.
43. Papp Z. Obstetrics Genetics / Papp Z. — Budapest: Akademiai Kiado, 1990. — 627 p.
44. Preimplantation diagnosis of common aneuploidies by first- and second-polar body FISH analysis / Verlinsky Y. [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. — 1998. — Vol. 15, N 5. — P. 285–289.
45. Prenatal diagnosis of chromosomal disorders in North-West Russia / Kuznetzova T. [et al.] // BJMG. — 1998. — Vol. 1, N 1. — P. 21–28.
46. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma / Lo Y. M., Hjelm N. M., Fidler C. [et al.] // N. Engl. J. Med. — 1998. — Vol. 339, N 24. — P. 1734–1748.
47. Proposed International Guidelines on Ethical Issues in Medical Genetics and Genetic Services: World Health Organization, Human Genetics Programme. Pt. II // Law Hum. Genome Rev. — 1998. — Vol. 9. — P. 239–251.
48. Rapid karyotyping in prenatal diagnosis: a comparative study of the 'pipette method' and the 'in situ' technique for chromosome harvesting / Claussen U. [et al.] // Prenat. Diagn. — 1993. — Vol. 13, N 12. — P. 1085–1093.
49. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 18 and triploidy in interphase nuclei of uncultured amniocytes by non-radioactive in situ hybridization / Christensen B. [et al.] // Prenat. Diagn. — 1992. — Vol. 12, N 4. — P. 241–250.
50. Simoni G. Fetal karyotyping by direct chromosome preparation / Simoni G., Tetzoli G., Romotti L. // Chorion villi sampling. — N.-Y., Basel: Marcel Dekker Inc., 1986. — P. 99–118.
51. Steele M. W. Chromosome analysis of human amniotic fluid cells / Steele M. W., Breg W. R. // Lancet. — 1966. — Vol. 1, N 7434. — P. 383–385.
52. The future of prenatal diagnosis: rapid testing or full karyotype? An audit of chromosome abnormalities and pregnancy outcomes for women referred for Down's Syndrome testing / Ogilvie C. M. [et al.] // BJOG — 2005. — Vol. 112, N 10. — P. 1369–1375.
53. Verlinsky Y. An atlas of Preimplantation genetic diagnosis / Verlinsky Y., Kuliev A. — N.-Y.: Pearl River, Parthenon, 2000. — 174 p.
54. Warburton D. Mosaic autosomal trisomy in cultures from spontaneous abortions / Warburton D., Yu C. Y., Kline J., Stein Z. // Am. J. Hum. Genet. — 1978. — Vol. 30, N 6. — P. 609–617.

PRENATAL KARYOTYPING: METHODS, PROBLEMS, PERSPECTIVES

Kuznetzova T. V.

■ **Summary:** The history and current trends in human karyotype analysis are outlined. Advantages and limitations of conventional cytogenetic methods and molecular genetic techniques used for chromosomes studies are described. Basic karyotyping terminology is presented. The main results of chromosomal studies in spontaneous abortions as well as in embryonic and fetal samples used for prenatal diagnosis at the I and II trimester are surveyed. Laboratory techniques for preimplantation genetic diagnosis as well for noninvasive diagnosis of chromosome disorders are mentioned. Perspectives of prenatal karyotyping are discussed.

■ **Key words:** prenatal diagnosis; chromosome disorders; chromosomal aberrations; karyotyping