

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.11.27-31>

Пренатальная диагностика: опыт за десять лет

Гайнер Т.А.^{1,2}, Каримова О.Г.^{1,2}, Таирова С.А.^{2,3}, Хрестина С.В.²

1 – Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук
630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, д. 8

2 – Группа компаний «Центр новых медицинских технологий» (ГК «ЦНМТ»)
630090, г. Новосибирск

3 – ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №2»
630051, г.Новосибирск, ул. Ползунова, д. 21

Введение. Отклонение от нормы количества или структуры хромосом является одной из причин нарушения развития плода. Около 0,5% новорожденных имеют хромосомные болезни, как правило, имеющие тяжелое течение. Ввиду этого огромное значение имеет пренатальная диагностика (ПД) хромосомных аномалий. В статье описаны преимущества разработанного в цитогенетической лаборатории ГК «ЦНМТ» способа культивирования клеток амниотической жидкости (АЖ), а также подводятся итоги работы лаборатории по исследованиям кариотипа плода за 10 лет.

Целью исследования стало проведение ПД хромосомной патологии методами классической цитогенетики в максимально краткие сроки с использованием высокого уровня разрешения дифференциального окрашивания хромосом.

Методы. Материал – образцы пуповинной крови, ворсин хориона/плаценты либо АЖ. Культивирование, приготовление препаратов метафазных хромосом и дифференциальное окрашивание хромосом проводили по стандартным протоколам. Окрашенные хромосомы анализировали с помощью светового микроскопа, для регистрации изображения использовали видеокамеру и соответствующее программное обеспечение. При описании хромосом использовали ISCN (2009).

Результаты. Специалистами лаборатории разработан способ, позволяющий сократить срок культивирования клеток АЖ до 8-13 дней, на него получен патент РФ. За десять лет было выполнено 228 исследований кариотипа плода, патология выявлена в 11,8% случаев. В лаборатории для всех видов ПД результативность составила 100%. Среди выявленной патологии доля структурных аномалий составила 40,7%.

Выводы. Оптимизация культивирования клеток АЖ позволяет быстро и в полном объеме провести анализ кариотипа плода. Полученные за десять лет результаты свидетельствуют о высокой эффективности работы лаборатории при проведении ПД.

Ключевые слова: пренатальная диагностика, цитогенетическое исследование, кариотип плода, хромосомная патология, амниотическая жидкость.

Для цитирования: Гайнер Т.А., Каримова О.Г., Таирова С.А., Хрестина С.В. Пренатальная диагностика: опыт за десять лет. *Медицинская генетика* 2022; 21(11): 27-31.

Автор для корреспонденции: Гайнер Т.А.; e-mail: tatyana@cnmt.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.10.2022

Prenatal diagnostics: a 10-year overview

Gayner T.A.^{1,2}, Karimova O.G.^{1,2}, Tairova S.A.^{2,3}, Hrestina S.V.²

1 – Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
8, Lavrentiev Avenue, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

2 – Group of companies «The Center for New Medical Technologies» (“CNMT”)
Novosibirsk, 630090, Russian Federation

3 – City clinical hospital №2
21, Polzunova str., Novosibirsk, 630051, Russian Federation

Introduction. Abnormal number or structure of chromosomes is known to be one of the reasons of birth defects. About 0.5% of newborns are known to display chromosomal diseases [1], which are as a rule, have severe manifestation. Clearly then, prenatal diagnostics (PD) of chromosomal anomalies is of vital importance. Here, we describe the advantages of the approach for cultivating the amniotic fluid (AF) cells, which has been developed in the cytogenetics lab of the CNMT, and summarize the results of karyotyping data spanning the period of 10 years.

Aim: to perform PD of chromosomal pathologies using the classical cytogenetics methods, and to do so with the shortest turnaround time possible using high-resolution differential chromosome staining technique.

Methods. Cord blood samples, chorionic/placental villi or AF. Ex vivo cell culture, metaphase chromosome spreads, differential chromosome staining using standard protocols. The stained chromosomes were analyzed under a light microscope and images were captured using a videocamera and processed with appropriate software. ISCN (2009) was used for chromosome descriptions.

Results. Laboratory associates have developed and patented the approach to shorten the AF cell culturing time to 8-13 days. Over the period of 10 years, 228 cytogenetic studies were performed, and chromosomal pathologies were uncovered in 11.8% cases. PD performance constituted 100%. Of all the chromosomal pathologies identified, chromosome rearrangements were observed in 40.7% samples.

Conclusions. Optimizing AF cell culture conditions has allowed to rapidly and comprehensively perform karyotyping of fetal cells. Laboratory performance in PD was very high.

Keywords: prenatal diagnostics, cytogenetic analysis, fetal karyotyping, chromosomal abnormality, amniotic fluid.

For citation: Gayner T.A., Karimova O.G., Tairova S.A., Hrestina S.V. Prenatal diagnostics: a 10-year overview. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2022; 21(11): 27-31. (In Russ.)

Corresponding author: Gayner T.A., e-mail: tatyana@cnmt.ru

Funding. The study was not sponsored.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Accepted: 20.10.2022

Введение

Хромосомные аномалии, как правило, вызывают нарушения развития плода, нередко весьма тяжелые. Поэтому при высоком риске хромосомной патологии у плода необходимо проведение цитогенетической пренатальной диагностики (ПД).

Несмотря на развитие методов молекулярно-цитогенетического анализа и неинвазивной диагностики, исследование кариотипа плода методами стандартной цитогенетики по-прежнему актуально благодаря универсальности, широкому охвату выявляемой патологии и относительно невысокой стоимости. Проведение такой диагностики возможно с использованием различных тканей: пуповинной крови, ворсин хориона/плаценты либо амниотической жидкости (АЖ). Каждый из таких подходов имеет свои преимущества и недостатки.

Самым достоверным методом ПД является кордоцентез, поскольку для анализа используется непосредственно плодный материал – пуповинная кровь. Этот материал несложно культивировать, при анализе возможно применение различных видов дифференциального окрашивания хромосом. Однако ввиду выполнения кордоцентеза не ранее 21-й недели беременности и высоких требований к квалификации акушера-оператора этот метод применяется все реже.

Преимуществами ПД по ворсинкам хориона/плаценты являются возможность забора материала на раннем сроке (с 10 недель) и скорость проведения исследования (при анализе «прямых» препаратов ворсин – 2–3 дня). Недостатками являются приводящий к ошибкам в диагностике плацентарный мозаицизм

(2% случаев) [1], риск получения недостаточного количества метафаз для проведения полного анализа, а также ограничение использования дополнительных методов окрашивания хромосом.

Наиболее безопасным способом ПД является амниоцентез. Основными недостатками стандартного метода кариотипирования плода по клеткам АЖ являются значительная длительность культивирования (до трех недель), получение в ряде случаев недостаточного количества материала для полного анализа, возможность артефактного мозаицизма, опасность инфицирования культуры.

В настоящей работе описаны преимущества разработанного в цитогенетической лаборатории ГК «ЦНМТ» способа культивирования клеток АЖ. Также в статье приводятся результаты работы лаборатории по ПД за 10 лет.

Целью исследования стало проведение ПД хромосомной патологии методами классической цитогенетики в максимально краткие сроки с использованием высокого уровня разрешения дифференциального окрашивания хромосом.

Методы

Культивирование лимфоцитов пуповинной крови, приготовление «прямых» препаратов ворсин хориона, пуповинной крови, АЖ и дифференциальное окрашивание хромосом проводили по стандартным методикам [1] с собственными модификациями. Дифференциально окрашенные хромосомы анализировали с использова-

нием светового микроскопа OLYMPUS CX41 (Япония), для регистрации изображения использовали видеокамеру и программное обеспечение ВидеоТест-Карио 3.1 фирмы ООО Иста-Видео Тест (Россия).

Для описания хромосом и хромосомных районов использовали стандартную номенклатуру хромосом человека [2].

Результаты и обсуждение

В цитогенетической лаборатории ГК «ЦНМТ» для исследования хромосом плода использовались все три вида исследований, однако доля их различна. Кордоцентез составил 9,7% от всех пренатальных исследований, анализ ворсин хориона был проведен в 22,8% случаев, доля амниоцентеза составила 67,5% (рис. 1).

В лаборатории за 10 лет (с 2012 по 2021 гг.) выполнено 22 цитогенетических исследования пуповинной крови (таблица). Анализ проведен на уровне разрешения GTG-дифференциального окрашивания 550-850 бэндов. Кариотип плода во всех случаях был нормальным.

За 10 лет выполнено 52 исследования ворсин хориона при развивающейся беременности, патология составила 17,3%. Собственные модификации методов приготовления препаратов и окрашивания позволили получить достаточное для анализа количество метафаз и провести анализ на уровне разрешения GTG-

окрашивания не менее 400 бэндов (в ряде случаев – 550 бэндов). Как показывает наш опыт, получение такого уровня GTG-окрашивания в хорионе необходимо для правильной постановки диагноза, особенно при выявлении структурных аномалий хромосом у плода.

Сотрудниками лаборатории разработан способ, позволяющий сократить срок культивирования клеток АЖ до 8-13 дней, повысить выход культивируемых клеток, снизить вероятность контаминации культур и артефактного мозаицизма. На разработанный способ в 2017 году получен патент РФ (№2630658).

Важным этапом разработанного способа является проведение однократного пассажа (трипсинизации) с учетом популяционной плотности клеток в колониях, что дает синхронизацию культуры. В дальнейшем это позволяет получить большое количество метафаз и дает возможность провести анализ с высоким уровнем разрешения GTG-дифференциального окрашивания (до 850 бэндов), использовать дополнительные виды окрашивания (CBG-, Ag-NOR), а также анализировать до 100 метафаз при подозрении на мозаицизм. В сложных случаях возможно использование оставшегося фиксированного материала для молекулярной диагностики.

Следует отметить, что на длительность культивирования клеток АЖ существенно влияет выбор момента проведения пассажа и доля открепившихся клеток. Оп-

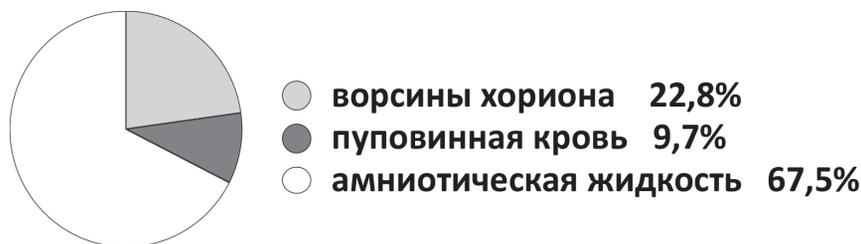


Рис. 1. Доля различных тканей при проведении ПД.

Fig. 1. Proportion of different tissues for PD.

Результаты ПД (2012-2021 гг).

Results of the PD (2012-2021).

Вид исследования	Срок беременности, нед.	Количество	Патология	Норма
Кордоцентез	20-21	22	-	22 (100%)
Анализ ворсин хориона	10-15	52	9 (17,3%)	43 (82,7%)
Амниоцентез	15-19	154	18 (11,7%)	136 (88,3%)
Итого		228	27 (11,8%)	210 (88,2%)

тимальный момент для пассажа – наличие в культуре клеток не менее трех плотных колоний, общее количество колоний – не менее 20–25. Желательно добиться при трипсинизации открепления максимального количества клеток, при этом время обработки культуры трипсином не должно превышать 3 мин во избежание гибели значительной доли клеток.

За 10 лет в лаборатории выполнено 154 исследования кариотипа плода в клетках АЖ. Патология выявлена в 11,8% случаев. Следует отметить, что иногда в ГК «ЦНМТ» ПД проводилась без медицинских показаний, по желанию беременной. В других лабораториях процент выявления патологии при проведении ПД существенно варьирует: 11,3% (г. Барнаул), 15,3% (г. Москва), 3,5%–9,6% в зависимости от показаний (г. Астана) [3].

Структурная патология была представлена транслокациями, инсерцией, инверсиями. Кроме того, был выявлен редкий случай дицентрической хромосомы dic(2;21) у плода (рис. 2).

Пациентка Я., 33 года, беременность 16 нед., по биохимическому скринингу выявлено незначительное снижение уровня PAPP-A, УЗИ в 14–15 нед. без особенностей. Выполнен амниоцентез, кариотип плода 45,XX,dic(2;21)(p25.3;p12). Серебрение показало

наличие ядрышковых организаторов в коротком плече дицентрической хромосомы (рис. 3). Кариотипы родителей нормальные. По заключению генетика, у плода присутствовал риск клинических проявлений (расстройства аутистического спектра, задержка развития, интеллектуальная недостаточность, МВПП) из-за хромосомного дисбаланса (частичной моносомии короткого плеча хромосомы 2). Было рекомендовано исследование материала плода методом FISH с теломерными зондами хромосомы 2 или в качестве альтернативного варианта – хромосомный микроматричный анализ на чипах высокого разрешения. При исследовании с теломерными зондами было подтверждено отсутствие теломерного района одного из гомологов хромосомы 2. Беременность прервана на сроке 18–19 нед.

Всего за десять лет пренатальная диагностика была выполнена в 228 случаях. По «Европейским стандартам для цитогенетических исследований» [4] процент успешных исследований при проведении ПД должен быть не менее 90–98% (в зависимости от вида исследования). В лаборатории ГК «ЦНМТ» для всех видов исследования результативность составила 100%.

Структурная патология выявлена в 40,7% случаев, что свидетельствует о высоком уровне проведения ис-

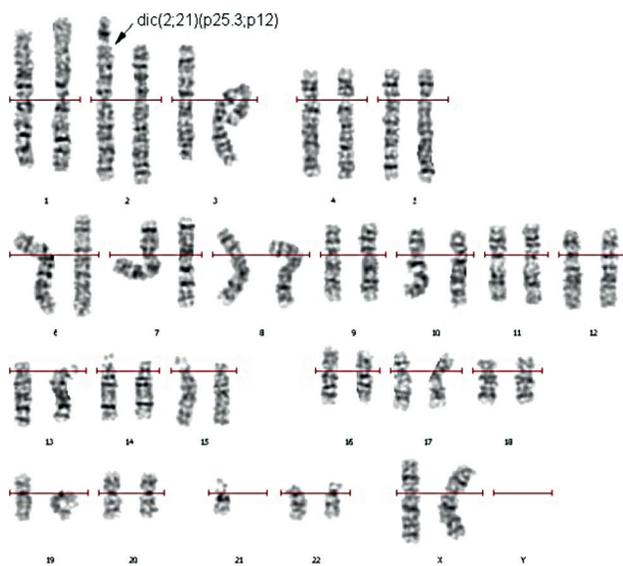


Рис. 2. Кариограмма плода. GTG-дифференциальное окрашивание.

Fig. 2. Fetal karyogram. GTG banding.



Рис. 3. Ag-NOR-окрашивание хромосом плода. Короткими стрелками обозначены районы ядрышковых организаторов в р-плечах акроцентрических хромосом, длинной стрелкой – в коротком плече дицентрической хромосомы.

Fig. 3. Ag-NOR staining of fetal chromosomes. Short arrows indicate the regions of nucleolar organizers in the p arms of acrocentric chromosomes, long arrows – in the short arm of the dicentric chromosome.

следований. Во многих других лабораториях этот показатель существенно ниже - 7,4% (Краснодарский край), 10% (г. Астана).

Выводы

Оптимизация культивирования клеток АЖ позволяет быстро и в полном объеме провести исследование хромосом плода. Использование GTG-окрашивания высокого разрешения и дополнительных методов окрашивания хромосом позволяет избежать ошибок при анализе кариотипа плода. Точный цитогенетический диагноз, поставленный в краткие сроки, имеет большое значение для медико-генетического прогноза. Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности работы лаборатории при проведении ПД.

Благодарность

Авторы статьи выражают благодарность Александру Викторовичу Шломе за помощь в работе над статьей.

Литература

1. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития. СПб: Издательство Н-Л. 2007; 640 с.
2. Shaffer L.G., Slovak M.L., Campbell L.J., editors. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Recommendations

of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, Switzerland: Karger. 2009.

3. Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Пренатальная диагностика наследственных и врожденных заболеваний: настоящее и будущее». Санкт-Петербург, Май 22-23, 2025. Медицинская генетика. 2015;14(4):64–83.
4. Рекомендации по обеспечению качества и надежности цитогенетических исследований. Европейские стандарты для цитогенетических исследований конститутивных и приобретенных хромосомных аномалий. Москва. 2007; 34с.

References

1. Baranov V.S., Kuznetsova T.V. Tsitogenetika embrional'nogo razvitiya [Cytogenetics of embryonic development]. SPb: Izdatel'stvo N-L [St. Petersburg: Publishing house N-L.] 2007; 640 p. (In Russ.)
2. Shaffer L.G., Slovak M.L., Campbell L.J., editors. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, Switzerland: Karger. 2009.
3. Tezisy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Prenatal'naya diagnostika nasledstvennykh i vrozhdennykh zabolevaniy: nastoyashcheye i budushcheye» [The Russian scientific-practical conference «Prenatal diagnostics of hereditary and congenital diseases: present and future» St.Petersburg, May 22—23, 2015]. *Meditsinskaya genetika [Medical Genetics]*. 2015;14(4):64-83. (In Russ.)
4. Rekomendatsii po obespecheniyu kachestva i nadezhnosti tsitogeneticheskikh issledovaniy. Yevropeyskiye standarty dlya tsitogeneticheskikh issledovaniy konstitutivnykh i priobretennykh khromosomnykh anomalii [Recommendations for ensuring the quality and reliability of cytogenetic studies. European standards for cytogenetic studies of constitutive and acquired chromosomal abnormalities]. Moscow. 2007; 34p. (In Russ.)