

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.09.38-48>

Эмбриональный мозаицизм как причина ошибок и дискордантных результатов пренатальной диагностики хромосомных болезней

Малышева О.В., Вашукова Е.С., Кольцова А.С., Ефимова О.А., Талантова О.Е., Пендина А.А., Чиряева О.Г., Шабанова Е.С., Беспалова О.Н., Глотов А.С.

НИИ Акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта
199034, г. Санкт-Петербург, Россия, Менделеевская линия, д. 3

Специалисты, работающие в области пренатальной диагностики хромосомных болезней, регулярно сталкиваются с проблемой мозаицизма. Хорошо известно существование мозаицизма, ограниченного плацентой, при котором у плода имеется нормальный хромосомный набор, а в плаценте могут быть обнаружены те или иные хромосомные аномалии. Существует, однако, и другой тип – эмбриональный мозаицизм. В этом случае в клетках плаценты может быть обнаружен нормальный хромосомный набор, при этом у плода имеется хромосомная патология. Также возможен вариант мозаицизма, при котором в плаценте и у плода присутствуют разные варианты аномального кариотипа. В данной работе рассматривается несколько клинических случаев эмбрионального мозаицизма, выявленных при проведении пренатальной диагностики хромосомных аномалий. В исследование вошли пять пациенток, которым выполнялись инвазивная пренатальная диагностика и/или неинвазивное пренатальное тестирование в НИИ АГиР им. Д. Отта в 2012-2023 гг. Диагностику хромосомной патологии выполняли с использованием стандартного кариотипирования, FISH, ХМА, НИПТ. Обсуждаются возможные причины дискордантных результатов и способы оптимизации диагностических алгоритмов.

Ключевые слова: мозаицизм, инвазивная пренатальная диагностика, НИПТ, хромосомная патология.

Для цитирования: Малышева О.В., Вашукова Е.С., Кольцова А.С., Ефимова О.А., Талантова О.Е., Пендина А.А., Чиряева О.Г., Шабанова Е.С., Беспалова О.Н., Глотов А.С. Эмбриональный мозаицизм как причина ошибок и дискордантных результатов пренатальной диагностики хромосомных болезней. *Медицинская генетика*. 2024; 23(9): 38-48.

Автор для корреспонденции: Малышева О.В.; **e-mail:** omal99@mail.ru

Финансирование. Работа подготовлена в рамках темы ФНИ 1021062512052-5-3.2.2.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 19.09.2024

Embryonic mosaicism as a cause of errors and discordant results of prenatal diagnosis of chromosomal diseases

Malysheva O.V., Vashukova E.S., Koltsova A.S., Efimova O.A., Talantova O.E., Pendina A.A., Chiryayeva O.G., Shabanova E.S., Bepalova O.N., Glotov A.S.

The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott
3, Mendeleevskaya Line, Saint Petersburg, 199034, Russian Federation

Specialists working in the field of prenatal diagnosis of chromosomal diseases regularly face the problem of mosaicism. The existence of placenta-limited mosaicism is well known, in which the fetus has a normal chromosomal set, and certain chromosomal abnormalities can be found in the placenta. There is, however, another type - embryonic mosaicism. In this case, a normal chromosomal set can be found in the cells of the placenta, while the fetus has a chromosomal pathology. A variant of mosaicism is also possible, in which different variants of the abnormal karyotype are present in the placenta and in the fetus. This paper examines several clinical cases of embryonic mosaicism identified during prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities, discusses possible causes of such results and ways to optimize diagnostic algorithms. The study included five patients who underwent invasive prenatal diagnostics and/or NIPT at the Institute of Obstetrics and Gynecology named after D. Ott in 2012-2023. Diagnosis of chromosomal pathology was performed using standard karyotyping, FISH, CMA, and NIPT. Possible reasons for discordant results and ways to optimize diagnostic algorithms are discussed.

Keywords: mosaicism, invasive prenatal diagnosis, NIPT, chromosomal pathology.

For citation: Malysheva O.V., Vashukova E.S., Koltsova A.S., Efimova O.A., Talantova O.E., Pendina A.A., Chiryayeva O.G., Shabanova E.S., Bepalova O.N., Glotov A.S. Embryonic mosaicism as a cause of errors and discordant results of prenatal diagnosis of chromosomal diseases. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2024; 23(9): 38-48. (In Russ.)

Corresponding author: Malysheva O.V.; **e-mail:** omal99@mail.ru

Funding. The work is carried out according to scientific research 1021062512052-5-3.2.2.

Conflict of Interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 19.09.2024

Введение

В пренатальной и постнатальной диагностике хромосомных нарушений проблема мозаицизма представляет собой один из самых сложных вызовов, стоящих как перед консультирующим врачом, так и перед специалистом, занимающимся лабораторной диагностикой. Хорошо известно существование мозаицизма ограниченного плацентой, когда при нормальном кариотипе плода в плаценте выявляются хромосомные аномалии. Менее известен другой вариант мозаицизма, когда в клетках плаценты может быть обнаружен нормальный хромосомный набор, а у плода имеется та или иная хромосомная патология (эмбриональный мозаицизм). Наконец, существует мозаицизм, при котором в плаценте и у плода присутствуют разные варианты аномального кариотипа. В данной работе рассматривается несколько клинических случаев эмбрионального мозаицизма, выявленных при пренатальной диагностике хромосомных аномалий.

Цель исследования: обсуждение возможных причин дискордантных результатов пренатальной диагностики хромосомных болезней и способов оптимизации диагностических алгоритмов.

Материалы и методы

В исследование вошли пять пациенток, которым выполнялись инвазивная пренатальная диагностика и/или неинвазивное пренатальное тестирование (НИПТ) в НИИ АГиР им. Д.О. Отта в 2012–2023 гг. Информированное добровольное согласие было получено от каждой пациентки до включения в исследование. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» (протокол №114 от 14.12.2021г.).

Цитогенетический и молекулярно-цитогенетический анализ биологических образцов

Пробоподготовку биологических образцов, приготовление препаратов метафазных хромосом и интерфазных ядер и их окрашивание проводили согласно стандартным протоколам [1]. Кариотипирование проводили, анализируя дифференциально окрашенные (QFН/АсD или GTG) метафазные пластинки ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови, культивированных амниоцитов и спонтанно делящихся клеток цитотрофобласта хориона/плаценты. Флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) проводили на

интерфазных ядрах из некультивированных ворсин хориона/плаценты, амниоцитов, тканей плода после прерывания беременности (печень, легкое) с использованием ДНК-зондов согласно рекомендациям фирм-производителей (Abbott Molecular, США; CytoTest, США; CytoCell, Великобритания). Микроскопический анализ препаратов проводили с помощью флуоресцентных микроскопов Axio Imager.Z2 (Carl Zeiss, Германия) и Leica DM 2500 (Leica Microsystems, Германия), оснащенных камерами высокого разрешения и программным обеспечением для получения и анализа цифровых фотоизображений.

Хромосомный микроматричный анализ (ХМА, сравнительная геномная гибридизация)

Для исследования выделяли тотальную ДНК из соответствующей ткани (ворсины хориона/плаценты, клетки амниотической жидкости, мышцы плода, периферическая кровь) с использованием стандартных методов (лизис с последующей фенол-хлороформной экстракцией или колоночные методы выделения ДНК). Выделенную и контрольную ДНК метили с использованием набора Sure Taq DNA Labeling Kit (Agilent, США) и проводили гибридизацию на ВАС-чипах Perkin-Elmer PKI или олигонуклеотидных чипах Agilent G5963A в соответствии с рекомендациями производителя. Сканирование и обработку полученных результатов производили с использованием сканера PerkinElmer RI и программного обеспечения Agilent CytoGenomics.

Неинвазивное пренатальное тестирование (НИПТ)

Для НИПТ использовали плазму крови беременных женщин. Кровь собирали в пробирки, содержащие в качестве консерванта 0,5 М раствор ЭДТА в случае кратковременного хранения или в пробирки, содержащие стабилизатор внеклеточной ДНК (GBM, Россия), при длительном хранении. Для получения плазмы крови проводили центрифугирование, как описано ранее [2]. Для выделения ДНК использовали набор реагентов «MGIEasy Circulating DNA Isolation Kit» (MGI, Китай) в соответствии с рекомендациями производителя. Подготовку библиотек осуществляли по протоколу набора «MGIEasy PCR-Free DNA Library Prep Set» (MGI, Китай). Полногеномное высокопроизводительное секвенирование подготовленных библиотек проводили на приборе DNBSEQ-G50 (MGI, Китай), используя набор «DNBSEQ-G50RS High-throughput Sequencing Set (FCL SE100)» (MGI, Китай). Полученные данные анализировали с помощью оригинального

биоинформатического протокола (патент RU 02712175 С1 20200124) [2, 3].

Результаты (клинические случаи)

Случай 1. Пациентка К., 27 лет. В первом триместре беременности выявлены ультразвуковые (УЗ) маркеры хромосомных анеуплоидий (ХА): шейная гигрома, отек плода, омфалоцеле. В 12 недель проведена инвазивная пренатальная диагностика (ИПД) (биопсия ворсин хориона), в прямых препаратах цитотрофобласта установлен нормальный мужской кариотип 46,XY. По желанию семьи беременность была пролонгирована, выявленный порок развития расценен как поддающийся хирургической коррекции. Родился ребенок с множественными врожденными пороками развития (МВПР), при кариотипировании ребенка выявлен добавочный материал на хромосоме 6; проведен ХМА на ВАС-чипах Perkin-Elmer RPI, выявлена частичная дупликация длинного плеча хромосомы 3 и частичная делеция длинного плеча хромосомы 6 (arr 3q25.31q29(157,472,198_199,538,208)x3, 6q27(170,144,686_170,885,453)x1 (рис. 1). Уточненный по результатам ХМА кариотип ребенка – 46,XY,der(6)t(3;6)(q25.3;q27). Родители кариотипированы в другой организации, хромосомных аномалий не выявлено.

Случай 2. Пациентка Д, 33 года, беременность первая, естественная. На раннем пренатальном скрининге (РПС) определен высокий риск трисомии хромосомы 21 (1:9), выявлены УЗ маркеры ХА у плода (ТВП 2,9 мм). Проведена ИПД (биопсия ворсин хориона), в прямых препаратах установлен нормальный мужской кариотип 46,XY. На УЗИ в 23/24 недели беременности выявлены такие УЗ маркеры как гипоплазия носовой кости плода 4,1 мм, макроглоссия, уплощенный профиль, гиперэхогенный фокус в левом желудочке, венгеруломегалия, укорочение длинных трубчатых костей. На сроке 24 недели 5 дней беременности выполнен кордоцентез с последующим исследованием кариотипа и ХМА методом aCGH на чипе Agilent G5963A. Установлен молекулярный кариотип arr(XY)x1,(21)x3 – трисомия хромосомы 21. Кариотип плода по пуповинной крови – 47,XY,+21, данных за мозаицизм у плода не получено.

Случай 3. Пациентка К, 39 лет, беременность третья, естественная. В анамнезе выкидыш на сроке 15/16 недель без УЗ маркеров и ВПР; замершая беременность в 7/8 недель без цитогенетического исследования. Кариотипы супругов нормальные. По УЗИ I триместра на

сроке 12 недель 6 дней выявлены МВПР у плода: двухсторонняя расщелина губы и неба, дефект межжелудочковой перегородки, эквиноварусная деформация обеих стоп, аномальная установка правой кисти. Выполнена биопсия ворсин хориона, проведено кариотипирование (прямые препараты ворсин хориона), установлен нормальный мужской кариотип 46,XY. По совокупности пороков развития, несмотря на нормальный результат кариотипа, семья на пренатальном консилиуме приняла решение о прерывании настоящей беременности. С целью установления возможных генетических причин патологии и определения прогноза для последующих беременностей было решено провести ХМА на том же биологическом материале (биоптат ворсин хориона). Выполнено исследование методом aCGH на чипе Agilent G5963A, установлен молекулярный кариотип arr(XY)x1,(18)x2~3 (значение Log Ratio для хромосомы 18 – 0,383). Беременность прервана, проведена верификация результатов по печени и легкому плода методом FISH на прямых препаратах (интерфазные ядра). В тканях плода выявлена мозаичная форма трисомии по хромосоме 18 с долей аномального клона 81-83% (рис. 2).

Случай 4. Пациентка Л., 34 года. ИМТ = 31,04 кг/м². Результаты РПС I триместра: ТВП = 2,1 мм. Кости носа определяются. В-ХГЧ = 0,963 МоМ; PAPP-A = 1,156 МоМ. Риск трисомии 21 – 1 : 5966; риск трисомии 18 – 1 : 14087; риск трисомии 13 – 1 : 20000. Во втором триместре при УЗИ выявлены МВПР плода: левосторонняя диафрагмальная грыжа, венгеруломегалия, повышение эхогенности головки хвостатого ядра с обеих сторон перивентрикулярных областей; укорочение плечевых костей у плода (0,1 процентиль); врожденный порок сердца (декстрапозиция); сужение легочной артерии. От проведения ИПД и пренатального консилиума семья отказалась. Образец крови на НИПТ был получен на сроке 21/22 недели, результат – фетальная фракция 6,69%, плод без хромосомной патологии, пол женский. На сроке 26 недель 1 день в ФГБУ «НИМЦ АГП им.В.И.Кулакова» выполнен амниоцентез, проведен ХМА (CytoScan, Affymetrix). По результатам исследования установлен молекулярный кариотип: arr[GRCh37]12p12.3q11(173786_37857751)x3. Проведено прерывание беременности, выполнена верификация результатов на материале плаценты и мышцы плода методом aCGH на чипе Agilent G5963A, получены следующие результаты: плацента – молекулярный кариотип arr[GRCh37] (X,1-22)x2, мышца плода – arr[GRCh37] (X)x2, (12p12.3p11)x3 (рис. 3).

Случай 5. Пациентка Л., 39 лет. Беременность вторая, есть дочь, здорова. Наблюдается у акушера-гинеколога с диагнозами нарушение менструального цикла, синдром поликистозных яичников. Кариотип пациентки не исследован. ИМТ = 18,82 кг/м². Образец крови на НИПТ был получен на сроке 10 недель 6 дней, показания – обеспокоенность состоянием плода. По результатам НИПТ у плода заподозрена моносомия по хромосоме X (значение риска находится в интервале между верхней границей моносомии X и нижней границей нормы). В связи с сомнительным

результатом и низкой фетальной фракцией (4,95%) проведено повторное взятие крови на сроке 12 недель 6 дней. Результат повторного НИПТ – фетальная фракция 10,76%, подозрение на моносомию по хромосоме X (значение риска в «серой» зоне). РПС выполнен на сроке 12,6 недель, УЗ маркеров и ВПР не выявлено. В-ХГЧ = 1,988 МоМ, РАРР-А = 0,306 МоМ, индивидуальный риск трисомии 21 – 1:20, высокий. На сроке 16 недель 0 дней выполнен забор околоплодных вод, материал направлен на кариотипирование культивированных клеток амниотической жидкости. В клетках

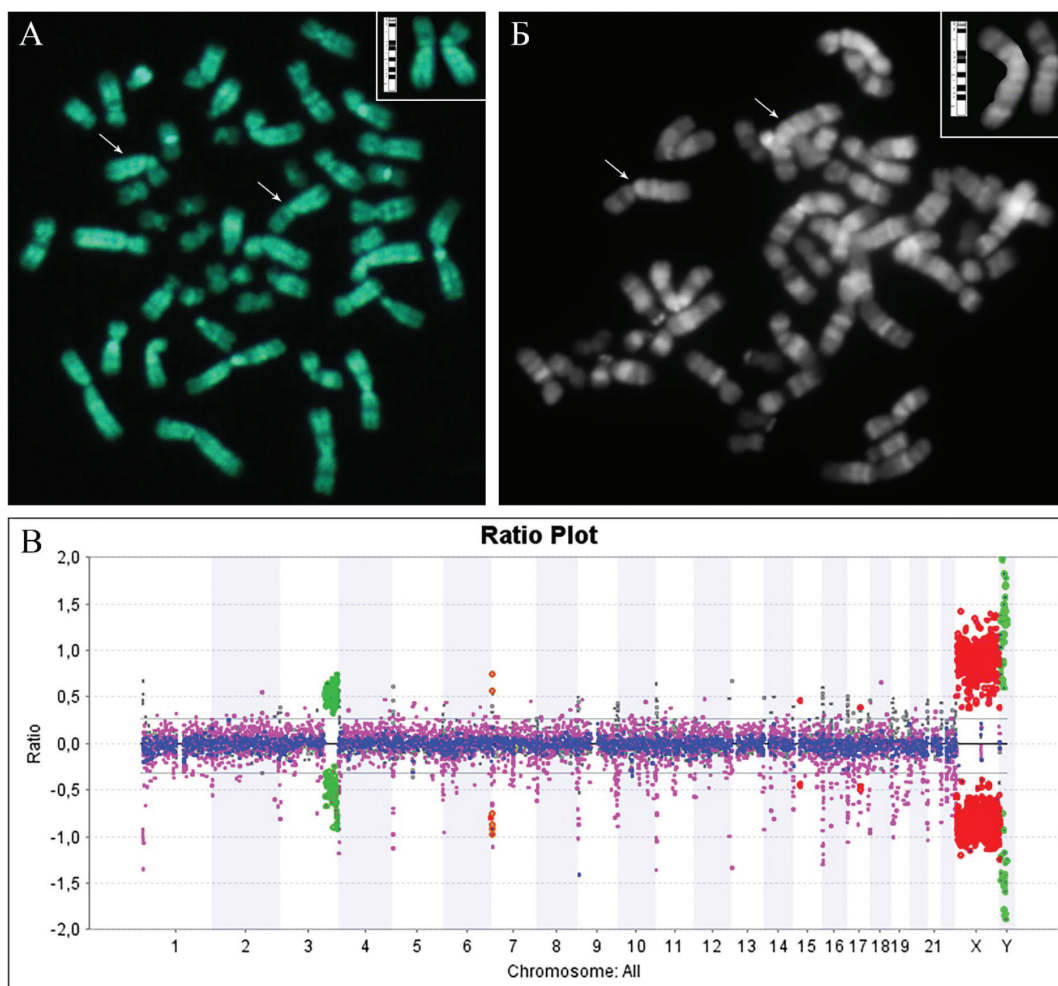


Рис. 1. Клинический случай 1. А – кариотип в клетках ворсин хориона; Б – кариотип в периферической крови ребенка; В – результаты ХМА (ВАС-чипы Perkin-Elmer PKI), ДНК из лимфоцитов периферической крови ребенка. На рис.1А и 1Б стрелки указывают на хромосому 6.

Fig. 1. Case 1. А – karyotype in chorionic villi cells; Б – karyotype in the peripheral blood of the child; В – results of CMA (Perkin-Elmer PKI BAC microarray), DNA from lymphocytes of the peripheral blood of the child. In Figure 1A and 1B, the arrows point to chromosome 6.

амниотической жидкости плода установлен кариотип 47,XXX[16]/45,X[14]. Дополнительно проведено определение числа копий хромосомы X в некультивированных клетках амниотической жидкости методом FISH. Было выявлено два аномальных клона клеток, отличающихся набором половых хромосом: один клон с трисомией по хромосоме X и второй клон с моносомией по хромосоме X, примерно в равном соотношении. Результат FISH – nuc ish(KAL×3, CEPX×3, CEP10×2)[320/628]/(KAL×1, CEPX×1, CEP10×2)[308/628]. Пациентка приняла решение о прерывании беременности.

Обсуждение

С точки зрения классической генетики все ткани, возникающие из одной зиготы, имеют одинаковый хромосомный набор. Однако в процессе онтогенеза могут происходить соматические мутации, которые приводят

к появлению двух и более клеточных линий, имеющих разный кариотип. В наибольшей степени хромосомный мозаицизм выражен на самых ранних этапах онтогенеза, о чем свидетельствуют результаты преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии (ПГТ-А). Показано, что на стадии 8 бластомеров (морула, 3 день после оплодотворения) до 30% эмбрионов являются мозаичными, а в дальнейшем, по-видимому, происходит самопроизвольная коррекция, сопровождающаяся элиминацией значительного количества анеуплоидных клеток. В результате этого процесса доля мозаичных эмбрионов снижается к 5 дню развития (стадия бластоцисты) до 5-7% [4]. Эти данные получены при проведении ПГТ-А в циклах вспомогательных репродуктивных технологий, но весьма вероятно, что они в значительной степени отражают закономерности, существующие при беременностях, наступивших естественным путем. Количественное соотношение сфор-

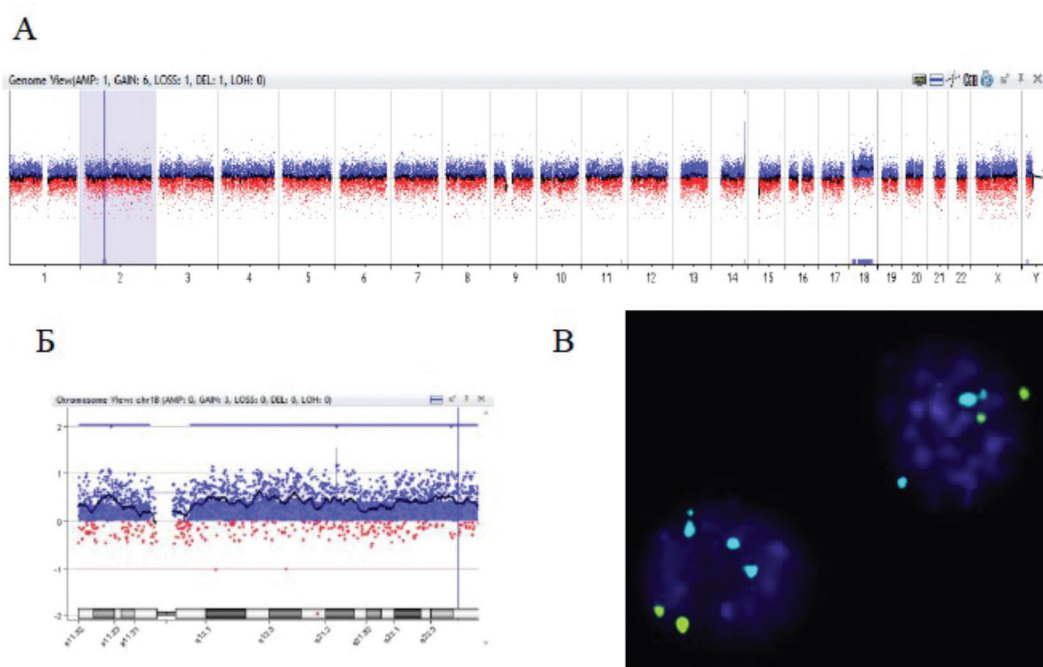


Рис. 2. Клинический случай 3. А – ХМА, ДНК из ворсин хориона – полногеномный результат; Б – То же, результат для хромосомы 18; значение log ratio 0,383 указывает на мозаичную трисомию по хромосоме 18; В – Верификация диагноза у плода методом FISH. Интерфазные ядра, окрашенные красителем DAPI, из клеток легкого плода после FISH с ДНК-зондами к околоцентромерному району хромосомы 11 (зеленый спектр свечения) и хромосомы 18 (голубой спектр свечения). ДНК-зонд к околоцентромерному району хромосомы 11 использован в качестве контрольного для определения пloidности клетки и эффективности FISH.

Fig. 2. Case 3. A – CMA, DNA from chorionic villi – whole genome result; Б – Same, result for chromosome 18; log ratio 0.383 indicates mosaic trisomy on chromosome 18; В – Verification of the diagnosis in the fetus by FISH. DAPI stained interphase nuclei from fetal lung cells after FISH with DNA probes to near-center regions of the chromosome 11 (green spectrum) and chromosome 18 (blue spectrum). DNA probe to the pericentromeric region of chromosome 11 was used as a control to determine cell ploidy and the efficiency of FISH.

мировавшихся клонов будет зависеть от времени возникновения мутации и сравнительной жизнеспособности разных клеточных линий и может значительно меняться в ходе онтогенеза.

Диагностика при хромосомном мозаицизме крайне сложна. В исследуемом материале может иметься выраженная внутри- и межтканевая вариабельность соотношения клонов с различным кариотипом. Методы, применяемые в пренатальной диагностике хромосомных заболеваний, значительно отличаются по типу анализируемых клеток и своей способности выявлять случаи мозаицизма, при этом разные методы лабораторной диагностики работают с разными клеточными типами в пределах этих тканей. В целом при проведении ИПД может быть проанализирован материал фетального происхождения (клетки амниотической жидкости, пуповинная кровь плода) и экстраэмбриональные ткани (ворсины хориона/плаценты). В последнее десятилетие также широкое распространение получил НИПТ. Стандартный НИПТ основан на анализе ДНК из плазмы крови матери, содержащей некоторое количество плацентарной ДНК (то есть ДНК из экстраэмбриональных тканей).

Необходимо отметить, что ворсины хориона/плаценты состоят из нескольких типов клеток: цитотрофобласта и его производного – синцитиотрофобласта (составляют наружные слои ворсин плаценты, происходят из трофобласта) и внезародышевой мезодермы (эти клетки находятся внутри ворсин и происходят от клеток эпибласта, производного внутренней клеточной массы (ВКМ), мигрирующих в формирующийся хорион) [5]. В периферическую кровь беременной женщины, которая анализируется при НИПТ, преимущественно попадает ДНК, происходящая от синцитиотрофобласта. При кариотипировании некультивированных ворсин хориона (т.н. «прямые» препараты), а также ворсин, подвергшихся краткосрочному культивированию, устанавливают кариотип клеток цитотрофобласта хориона, тогда как при кариотипировании ворсин, подвергшихся долгосрочному культивированию, – кариотип клеток внезародышевой мезодермы. При использовании молекулярных методов исследования ворсин хориона/плаценты (КФ-ПЦР, ХМА) происходит выделение ДНК из всей ворсины и анализируется смесь всех клеточных типов. Таким

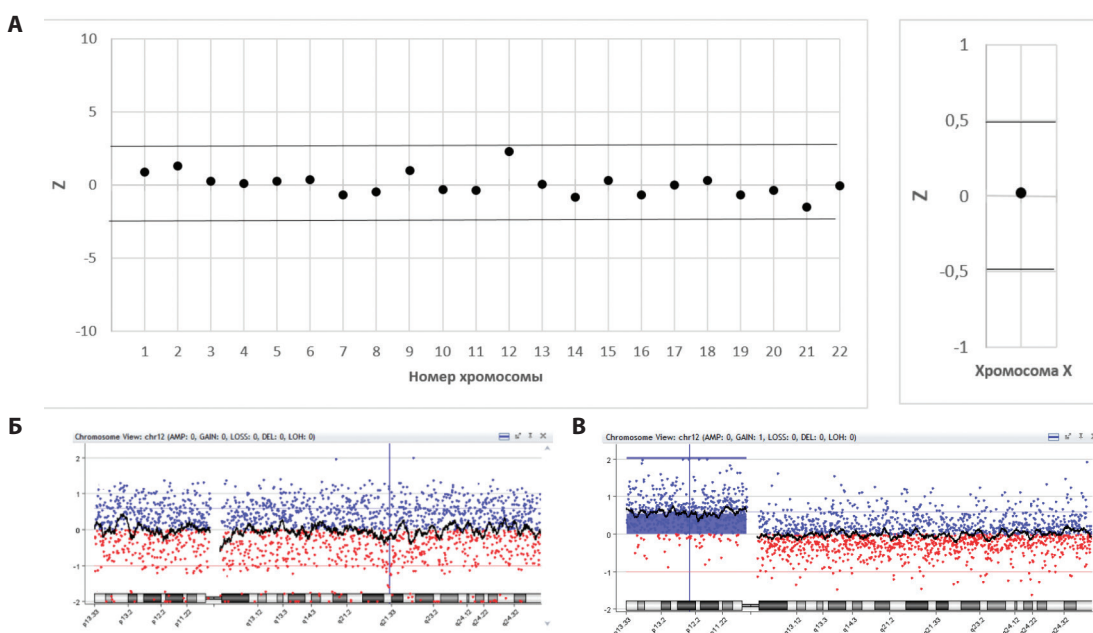


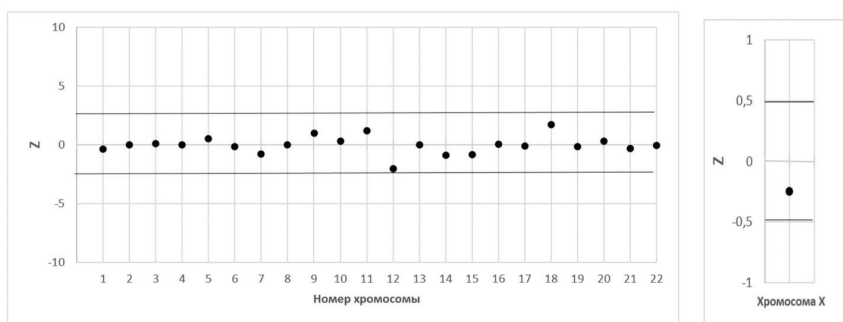
Рис. 3. Клинический случай 4. А – Результат НИПТ. Линии соответствуют нижней и верхней границам значений Z-метрики, при которых у плода отсутствуют хромосомные аномалии; Б – ХМА, ДНК из ворсин плаценты мышца плода – результат для хромосомы 12, без патологии; В – ХМА, ДНК из мышцы плода – результат для хромосомы 12.

Fig. 3. Case 4. А – NIPT result. The lines correspond to the lower and upper boundaries of the Z-metric values, in which the fetus has no chromosomal abnormalities; Б – CMA, DNA from placental villi – the result for chromosome 12, without pathology; В – CMA, DNA the fetal muscle – result for chromosome 12.

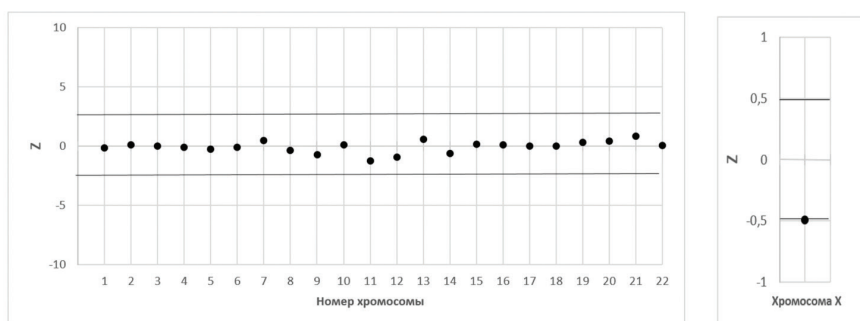
образом, возможное расхождение результатов пренатальной диагностики, полученное при использовании разных тканей и методов анализа, представляется вполне вероятным. Подобные случаи описаны в литерату-

ре [6, 7], и обсуждаемые в данной работе клинические примеры подтверждают это представление. В табл. 1 суммирована информация по методам пренатальной диагностики хромосомных заболеваний с точки зре-

А



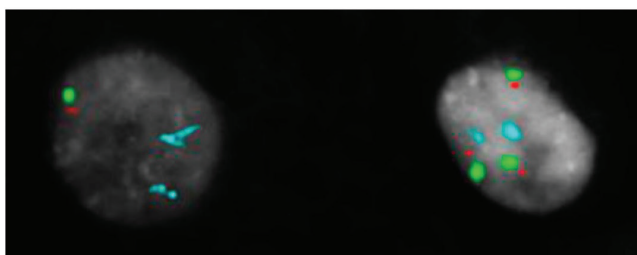
Б



В



Г



Д

Рис. 4. Клинический случай 5. А – Результат НИПТ на сроке 10 недель 6 дней; Б – Результат НИПТ на сроке 12 недель 6 дней; В,Г – кариограммы метафазных хромосом из культивированных клеток амниотической жидкости с моносомией (В) и трисомией (Г) по хромосоме X (QFH/AcD-окрашивание, представлено инвертированное изображение); Д – интерфазные ядра из некультивированных клеток амниотической жидкости с моносомией (слева) и трисомией (справа) по хромосоме X после FISH с ДНК-зондами к локусу KAL (красный) короткого плеча хромосомы X и околоцентромерным районам хромосом X (зеленый) и 10 (голубой). ДНК-зонд к околоцентромерному району хромосомы 10 использован в качестве контрольного для определения ploidy клетки и эффективности FISH.

Fig. 4. Case 5. A – NIPT result at 10 weeks 6 days; Б – NIPT result at 12 weeks 6 days; В, Г – karyograms of metaphase chromosomes from cultured amniotic fluid cells with monosomy (B) and trisomy (Г) on chromosome X (QFH/AcD staining, inverted image shown); Д – interphase nuclei from uncultured amniotic fluid cells with monosomy (left) and trisomy (right) on chromosome X after FISH with DNA probes to the KAL locus (red) of the short arm of chromosome X and near-center regions of chromosomes X (green) and 10 (blue). A DNA probe to the pericentromeric region of chromosome 10 was used as a control to determine cell ploidy and the efficiency of FISH.

ния анализируемой ткани и способности выявлять внутритканевую мозаицизм.

В научной литературе выделяют 6 или 7 типов хромосомного мозаицизма [5, 7, 8]. Типы I-III представляют мозаицизм, ограниченный плацентой (аномальный клон присутствует в тех или иных тканях плаценты, кариотип плода нормальный). Типы IV-VII представляют случаи эмбрионального мозаицизма с разной представленностью аномального клона в плаценте и аномальным кариотипом плода. Информация о типах хромосомного мозаицизма представлена в **табл. 2**. Как следует из **табл. 2**, в данной работе обсуждаются клинические случаи мозаицизма V и VII типов, а также один случай VI типа.

Наша подборка клинических случаев демонстрирует разные типы эмбрионального мозаицизма. Такие случаи могут быть связаны как с анеуплоидия-

ми (случаи 2, 3, 5), так и с хромосомными мутациями (1, 4). Случаи 1 и 2 иллюстрируют несовпадение хромосомного набора между тканями экстраэмбрионального и фетального происхождения. В обоих случаях первоначальный кариотип был установлен при анализе прямых препаратов ворсин хориона (экстраэмбриональная ткань, цитотрофобласт), а затем выполнена повторная диагностика по периферической крови ребенка (случай 1) и по клеткам пуповинной крови плода (случай 2). В случае 1, по-видимому, в клетках ВКМ произошла постзиготическая хромосомная мутация (терминальная делеция хромосомы 6 с получением дополнительного материала хромосомы 3). Известно, что во многих случаях возникновение подобных несбалансированных транслокаций может быть связано с коррекцией трисомии мейотического происхождения (в данном случае трисомии по хромосоме

Таблица 1. Методы диагностики хромосомных заболеваний: анализируемая ткань и способность выявлять мозаицизм

Table 1. Methods for diagnosing chromosomal diseases: analyzed tissue and the ability to detect mosaicism

Срок проведения процедуры	I-II триместр			II триместр		
	НИПТ	Хорионбиопсия / Плацентобиопсия		Амниоцентез	Кордоцентез	
Эмбриологическое происхождение анализируемого материала	Экстраэмбриональная эктодерма		Экстраэмбриональная мезодерма	Экстраэмбриональная и эмбриональная эктодерма	Эмбриональная мезодерма	
Клеточное происхождение анализируемого материала	Клетки синцитиотрофобласта хориона / плаценты	Клетки цитотрофобласта хориона / плаценты	Клетки хориальной мезодермы	Клетки амниотической жидкости	Т-лимфоциты пуповинной крови	Остальные типы ядерных клеток крови
Методы исследования	Секвенирование следующего поколения (NGS) ПЦР в реальном времени	1. Кариотипирование некультивированных клеток ворсин хориона; 2. Кариотипирование краткосрочной культуры клеток ворсин хориона	1. Кариотипирование долгосрочной культуры клеток ворсин хориона	1. КФ-ПЦР 2. ХМА 3. Кариотипирование долгосрочной культуры клеток 4. FISH на интерфазных ядрах из некультивированных клеток	1. Кариотипирование краткосрочной культуры клеток 2. FISH на интерфазных ядрах из культивированных клеток	-
		1. ХМА 2. КФ-ПЦР 3. FISH на интерфазных ядрах из некультивированных клеток			1. FISH на интерфазных ядрах из некультивированных клеток 2. ХМА 3. КФ-ПЦР	
Способность методов выявлять внутритканевую мозаицизм (с указанием % аномального клона)	1. НИПТ – не предназначен 2. КФ-ПЦР – не предназначен 3. ХМА – от 20% и более 4. Кариотипирование – от 20% и менее (при анализе 15 метафазных пластинок и более) [9] 5. FISH на интерфазных ядрах – от 1% и менее (при анализе 300 клеток и более) [9]					

3) или с репарацией спонтанно возникающих терминальных делеций (в случае 1 – делеции хромосомы 6) [10]. Показано, что в возникновении таких перестроек могут принимать участие одновременно хромосомы и материнского, и отцовского происхождения, что неоспоримо свидетельствует о возможности постзиготического происхождения дериватных хромосом [10]. В случае 2 можно предполагать возникновение геномной мутации (трисомии по хромосоме 21) в результате митотического нерасхождения в клетках ВКМ или спонтанную коррекцию трисомии мейотического происхождения в клетках цитотрофобласта. К сожалению, исследование материала хориона/плаценты с использованием других подходов в этих двух случаях не проводилось, поэтому невозможно однозначно классифицировать тип мозаицизма (V или VII). Возможно, проведение ХМА на материале ИПД (ворсины хориона/плаценты) позволило бы выявить хромосомную патологию плода (как в случае 3), но могло бы не дать нужного результата (как в случае 4).

Случай 3 демонстрирует несовпадение хромосомного набора в клетках ворсин плаценты разного происхождения. Прямые препараты ворсин хориона показывают нормальный кариотип в клетках цитотрофобласта – производного трофобласта. Однако при проведении молекулярно-генетического исследования с использованием ДНК, выделенной из всех клеток ворсин плаценты, включая как клетки цитотрофобласта и синцитиотрофобласта, так и внезародышевой мезодермы, в том же самом биологическом материале была установлена мозаичная трисомия по хромосоме 18, и этот диагноз был подтвержден при исследовании плода после прерывания беременности. Таким образом, в этом случае геномная мутация (трисомия

по хромосоме 18) отсутствовала в клетках цитотрофобласта, но присутствовала во всех клетках, происходящих от ВКМ. Этот случай демонстрирует явление истинного эмбрионального мозаицизма V типа.

Случай 4 представляет собой довольно редкий вариант ограниченного эмбрионального мозаицизма (VII тип), когда аномальный кариотип представлен только в клетках плода. При проведении НИПТ (анализ ДНК плацентарного происхождения, преимущественно производных трофобласта) и молекулярно-генетического кариотипирования (анализ ворсин плаценты, совокупность всех клеток) хромосомной патологии плода выявлено не было; при этом при анализе клеток амниотической жидкости и мышцы плода установлено наличие хромосомной мутации – дополнительного материала короткого плеча хромосомы 12. Верификация результатов методом ХМА на материале, полученном после прерывания беременности, позволила утверждать, что в этом случае хромосомная мутация присутствует только в тканях плода и отсутствует во всех экстраэмбриональных тканях.

Случай 5 несколько отличается от других, рассмотренных ранее, прежде всего тем, что при первичном исследовании (НИПТ) у плода была заподозрена хромосомная аномалия – моносомия по хромосоме X. Для мозаичных анеуплоидий по хромосоме X довольно типично наличие двух, трех, а иногда и более, клеточных линий. Очень важно, что при молекулярно-генетическом исследовании амниотической жидкости (методом КФ-ПЦР или с использованием ХМА) с высокой вероятностью был бы получен отрицательный результат («хромосомного дисбаланса не выявлено»), поскольку клоны с моносомией и трисомией X суммарно скомпенсировали бы друг друга. В этом случае

Таблица 2. Типы хромосомного мозаицизма по [5,7] с изменениями

Table 2. Types of chromosomal mosaicism according [5,7] with changes

Тип мозаицизма	Цитотрофобласт	Внезародышевая мезенхима	Плод
Мозаицизм, ограниченный плацентой			
I	Аномальный	Нормальный	Нормальный
II	Нормальный	Аномальный	Нормальный
III	Аномальный	Аномальный	Нормальный
Истинный эмбриональный мозаицизм			
IV	Аномальный	Нормальный	Аномальный
V	Нормальный	Аномальный	Аномальный
VI	Аномальный	Аномальный	Аномальный
VII	Нормальный	Нормальный	Аномальный

адекватная диагностика мозаицизма возможна только при цитогенетическом или молекулярно-цитогенетическом (FISH) исследованиях.

По данным литературы, частота мозаицизма, выявляемого при ИПД, оценивается в 2-3%, причем в большинстве случаев речь идет преимущественно о мозаицизме, ограниченном плацентой, частота которого составляет 85-90% от всех выявленных случаев [7, 11, 12]. Истинный мозаицизм (тип VI) и эмбриональный мозаицизм (типы IV, V, VII) встречаются гораздо реже (суммарно не более 10-15% от всех случаев выявленного мозаицизма). По данным Мальвестити с соавт., обработавших результаты 60 347 ИПД по ворсинкам хориона, исследованным разными способами (краткосрочные и долгосрочные культуры с последующей верификацией результатов по амниоцитам), мозаицизм V типа был зарегистрирован в 57 случаях (один случай на 1059 ИПД), а истинный мозаицизм VI типа – в 60 случаях (один случай на 1006 ИПД) [7]. Сбор данных по ложно-отрицательным результатам ИПД вследствие мозаицизма VII типа является существенно более сложной задачей, и такие сведения в литературе немногочисленны. По данным исследователей из Нидерландов, частота такого типа мозаицизма составила 2 случая из 2389 ИПД I триместра (0,08%) [13]; этот тип является самым редким вариантом мозаицизма.

Таким образом, дискордантность кариотипа между плодом и плацентой, является редким, но не уникальным событием. Также возможна дискордантность результатов ИПД, полученных при исследовании ворсин плаценты с использованием разных подходов. Это относится как к вариантам анеуплоидий (клинические случаи 2, 3, 5), так и к вариантам хромосомных мутаций (случаи 1, 4). Для медико-генетического консультирования в случаях подозрения на мозаицизм можно дать следующие рекомендации:

При нормальном результате НИПТ и наличии УЗ маркеров ХА у плода следует назначить ИПД и отдавать предпочтение анализу материала плодного происхождения (аниоцентез, кордоцентез) [14].

При высоком риске ХА у плода (выявление УЗ маркеров ХА и/или риск по РПС более 1:100) следует проводить ИПД, желательно по материалу плодного происхождения, а не НИПТ [14, 15].

При нормальном результате ИПД по ворсинкам хориона/плаценты и нарастании представленности УЗ маркеров ХА следует рекомендовать повторную ИПД по материалу фетального происхождения (амниоцентез, кордоцентез). В некоторых случаях можно переанализировать имеющийся материал (ворсины хорио-

на) с использованием принципиально других методов (см.табл.1), но этот подход может быть неинформативен у некоторых пациентов.

При ИПД следует ориентироваться на методы, способные достоверно выявлять мозаицизм. Мозаицизм от 15-20% может быть выявлен с использованием ХМА и при стандартном кариотипировании, для выявления мозаицизма с меньшей долей аномальных клеток следует дополнительно подключать к обследованию пациента молекулярно-цитогенетические методы (FISH на интерфазных ядрах). Метод КФ-ПЦР не предназначен для выявления мозаицизма.

При подозрении на аномалии половых хромосом предпочтительным методом анализа будет кариотипирование культивированных клеток амниотической жидкости или лимфоцитов пуповинной крови плода, сопряженное с FISH на интерфазных ядрах из некультивированных клеток.

Заключение

Случаи эмбрионального мозаицизма составляют небольшой, но всё-таки значимый процент от всех беременностей. Любая лаборатория, выполняющая ПД хромосомных нарушений у плода, сталкивается с данным явлением. Рассмотренные в статье случаи демонстрируют многогранность феномена хромосомного мозаицизма и разнообразие методов, которые могут быть использованы для его детекции. Приведенные случаи свидетельствуют о необходимости тесного взаимодействия между акушерами-гинекологами, специалистами УЗ диагностики, клиническими и лабораторными генетиками. Тактика обследования каждой пациентки с подозрением на ХА у плода должна приниматься коллегиально, с учетом как клинической картины, так и технических особенностей генетических методов.

Литература

1. Кузнецова Т.В., Логинова Ю.А., Чиряева О.Г. и др. Цитогенетические методы. В: «Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике» в 2 т. 3-е изд. перераб. и доп, ред. А.И.Карпищенко. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2013;2:623-657
2. Тарасенко О.А., Вашукова Е.С., Козюлина П.Ю. и др. Опыт применения высокопроизводительного секвенирования (NGS) для проведения неинвазивного пренатального скрининга анеуплоидий плода на базе ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта». Акушерство и гинекология. 2022;10:37-49 doi:10.18565/aig.2022.10.37-49.
3. Козюлина П.Ю., Вашукова Е.С., Готов А.С. и др. Способ неинвазивного пренатального скрининга анеуплоидий плода. Номер патента: RU 2712175 С1. Дата публикации: 24.01.2020.

4. McCoy R.C. Mosaicism in Preimplantation Human Embryos: When Chromosomal Abnormalities Are the Norm. *Trends Genet.* 2017 Jul;33(7):448-463. doi: 10.1016/j.tig.2017.04.001.
 5. Лебедев И.Н., Назаренко С.А. Тканеспецифичный плацентарный мозаицизм по аутосомным трисомиям у спонтанных абортусов человека: механизмы формирования и фенотипические эффекты. *Генетика*, 2001, том 37, № 11, с. 1459-1474.
 6. Hamilton S.J., Waters J.J. Completely discrepant results between prenatal QF-PCR rapid aneuploidy testing and cultured cell karyotyping obtained from CVS: lessons from UK audit and re-audit of 22,221 cases. *Prenat Diagn.* 2012 Sep;32(9):909-11. doi: 10.1002/pd.3915.
 7. Malvestiti F., Agrati C., Grimi B. et al. Interpreting mosaicism in chorionic villi: results of a monocentric series of 1001 mosaics in chorionic villi with follow-up amniocentesis. *Prenat Diagn.* 2015 Nov;35(11):1117-27. doi: 10.1002/pd.4656.
 8. McKinlay Gardner R.J., Amor D.J. Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling: Fifth edition, London, 2018. Doi:10.1093/med/9780199329007.001.0001
 9. Hook E.B. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am. J. Hum. Genet.* 1977 Jan;29(1):94-7.
 10. Bonaglia M., Kurtas N.E., Errichiello E. et al. De novo unbalanced translocations have a complex history/aetiology. *Human Genetics.* 2018 137:817–829 doi:10.1007/s00439-018-1941-9
 11. Сивик А.А., Тетруашвили Н.К. Плацентарный мозаицизм и осложнения беременности. *Медицинский Совет.* 2021;(13):138-143. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-13-138-143>
 12. Grati F.R., Ferreira J., Benn P., et al. Outcomes in pregnancies with a confined placental mosaicism and implications for prenatal screening using cell-free DNA. *Genet Med.* 2020 Feb;22(2):309-316. doi: 10.1038/s41436-019-0630-y.
 13. van den Berg C., Van Opstal D., Polak-Knook J., Galjaard R.J. (Potential) false-negative diagnoses in chorionic villi and a review of the literature. *Prenat Diagn.* 2006 May;26(5):401-8. doi: 10.1002/pd.1421.
 14. Сухих Г.Т., Трофимов Д.Ю., Барков И.Ю. и др. Методические рекомендации «Проведение неинвазивного пренатального ДНК-скрининга анеуплоидий плода по крови матери (НИПС) методом высокопроизводительного секвенирования». *Акушерство и гинекология.* 2024; 3 (Приложение): 4-24. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2024.51>
 15. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 20 октября 2020 г. N 1130н Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология». <https://base.garant.ru/74840123/> Дата доступа: 14.05.2024
- References**
1. Kuznetsova T.V., Loginova Yu.A., Chiryayeva O.G., et al. Tsitogeneticheskiye metody. V: «Meditsinskiye laboratornyye tekhnologii: rukovodstvo po klinicheskoy laboratornoy diagnostike» v 2 t. 3-ye izd. pererab. i dop, red. A.I.Karpishchenko [Cytogenetic methods. In: «Medical laboratory technologies: a guide to clinical laboratory diagnostics» in 2 volumes. 3rd ed. revised and enlarged, ed. A.I.Karpishchenko]. Moscow: GEOTAR-Media. 2013;2:623-657. (In Russ.)
 2. Tarasenko O.A., Vashukova E.S., Kozyulina P.Yu., et al. Opyt primeneniya vysokoproizvoditel'nogo sekvenirovaniya (NGS) dlya provedeniya neinvazivnogo prenatal'nogo skrininga aneuploidiy ploda na baze FGBNU «NII AGiR im. D.O. Otta» [Experience of using high-throughput sequencing (NGS) for noninvasive prenatal screening of fetal aneuploidy at the D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproduction]. *Akusherstvo i Ginekologiya [Obstetrics and Gynecology]*. 2022;10:37-49 doi:10.18565/aig.2022.10.37-49. (In Russ.)
 3. Kozyulina P.Yu., Vashukova E.S., Glotov A.S. et al. Sposob neinvazivnogo prenatal'nogo skrininga aneuploidiy ploda [Method of non-invasive prenatal screening of fetal aneuploidies]. Patent number: RU 2712175 C1. Publication date: 01/24/2020. (In Russ.)
 4. McCoy R.C. Mosaicism in Preimplantation Human Embryos: When Chromosomal Abnormalities Are the Norm. *Trends Genet.* 2017 Jul;33(7):448-463. doi: 10.1016/j.tig.2017.04.001.
 5. Lebedev I.N., Nazarenko S.A. Tissue-Specific Placental Mosaicism for Autosomal Trisomies in Human Spontaneous Abortuses: Mechanisms of Formation and Phenotypical Effects. *Russian Journal of Genetics.* 2001; 37: 1224–1237. <https://doi.org/10.1023/A:1012544706246>
 6. Hamilton S.J., Waters J.J. Completely discrepant results between prenatal QF-PCR rapid aneuploidy testing and cultured cell karyotyping obtained from CVS: lessons from UK audit and re-audit of 22,221 cases. *Prenat Diagn.* 2012 Sep;32(9):909-11. doi: 10.1002/pd.3915.
 7. Malvestiti F., Agrati C., Grimi B. et al. Interpreting mosaicism in chorionic villi: results of a monocentric series of 1001 mosaics in chorionic villi with follow-up amniocentesis. *Prenat Diagn.* 2015 Nov;35(11):1117-27. doi: 10.1002/pd.4656.
 8. McKinlay Gardner R.J., Amor D.J. Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling: Fifth edition, London, 2018. Doi:10.1093/med/9780199329007.001.0001
 9. Hook E.B. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am. J. Hum. Genet.* 1977 Jan;29(1):94-7.
 10. Bonaglia M., Kurtas N.E., Errichiello E. et al. De novo unbalanced translocations have a complex history/aetiology. *Human Genetics.* 2018 137:817–829 doi:10.1007/s00439-018-1941-9
 11. Sivik A.A., Tetruashvili N.K. Platsentarnyy mozaitizm i oslozhneniya beremennosti. [Placental mosaicism and complications of pregnancy]. *Meditsinskiy Sovet [Medical Council]*. 2021;(13):138-143. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-13-138-143> (In Russ.)
 12. Grati F.R., Ferreira J., Benn P., et al. Outcomes in pregnancies with a confined placental mosaicism and implications for prenatal screening using cell-free DNA. *Genet Med.* 2020 Feb;22(2):309-316. doi: 10.1038/s41436-019-0630-y.
 13. van den Berg C., Van Opstal D., Polak-Knook J., Galjaard R.J. (Potential) false-negative diagnoses in chorionic villi and a review of the literature. *Prenat Diagn.* 2006 May;26(5):401-8. doi: 10.1002/pd.1421.
 14. Sukhikh G.T., Trofimov D.Yu., Barkov I.Yu. et al. Metodicheskiye rekomendatsii «Provedeniye neinvazivnogo prenatal'nogo DNK-skrininga aneuploidiy ploda po krvi materi (NIPS) metodom vysokoproizvoditel'nogo sekvenirovaniya» [Methodical recommendations «Conducting non-invasive prenatal DNA screening of fetal aneuploidies using maternal blood (NIPS) using high-throughput sequencing»]. *Akusherstvo i Ginekologiya [Obstetrics and Gynecology]*. 2024; 3 (Suppl.): 4-24. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2024.51> (In Russ.)
 15. Prikaz Ministerstva zdravookhraneniya RF ot 20 oktyabrya 2020 g. N 1130n Ob utverzhenii Poryadka okazaniya meditsinskoy pomoshchi po profilyu «akusherstvo i ginekologiya» [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated October 20, 2020 N 1130n On approval of the Procedure for the provision of medical care in the profile of «obstetrics and gynecology»]. <https://base.garant.ru/74840123/> Access date: 14.05.2024 (In Russ.)