

На правах рукописи

ШИЛОВА НАДЕЖДА ВЛАДИМИРОВНА

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ДИАГНОСТИКЕ
ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ
В РАМКАХ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва - 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр»

Официальные оппоненты:

Асанов Алий Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской генетики Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Акуленко Лариса Вениаминовна - доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой медицинской генетики Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Демикова Наталия Сергеевна - доктор медицинских наук, профессор кафедры медицинской генетики с курсом пренатальной диагностики Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия последипломного образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Томский национальный исследовательский медицинский центр"

Защита диссертации состоится «__» _____ 2016 года в _____ часов на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 001.016.01 при Федеральном Государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр» по адресу: 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр» по адресу: 115478, Москва, ул. Москворечье, д.1.

Автореферат разослан «__» _____ 2016

Ученый секретарь Диссертационного совета
Д 001.016.01 по защите диссертаций
на соискание ученой степени кандидата наук,
на соискание ученой степени доктора наук,
доктор медицинских наук, профессор

**Зинченко
Рена Абульфазовна**

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Хромосомные болезни (ХБ) занимают одно из ведущих мест в структуре врожденной и наследственной патологии человека. Хромосомные аномалии (ХА), в частности анеуплоидии, более чем в половине случаев являются причиной ранних доимплантационных потерь и спонтанных выкидышей (Баранов В.С., Кузнецова Т.В., 2007; Лебедев И.Н., Никитина Т.В., 2013). Вклад ХА в заболеваемость новорожденных составляет примерно 1,0%, при этом до 80% них составляют анеуплоидии (Boyd P., 2010; Gardner R. J. et al., 2012). ХА выявляются примерно в 15% случаев множественных врожденных аномалий и пороков развития, диагностированных в течение первого года жизни и в 25% случаев ассоциированы с перинатальной смертностью (Zeiltein J. et al., 2009).

Высокая частота, клиническая и социальная значимость ХБ обуславливает разработку и совершенствование подходов, направленных на повышение эффективности их профилактики и диагностики. Актуальность профилактики и диагностики ХБ определяется также идеей персонализации современной медицины, т.е. индивидуального подхода к каждому пациенту. В классификации диагностических технологий, относящихся к персонализированной медицине, особое место отводится цитогенетическим и молекулярно-цитогенетическим методам исследования, таким как флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) и хромосомный микроматричный анализ (ХМА) (Jain K., 2009). Отмечая важную роль диагностики заболеваний на молекулярном уровне и значение классической и молекулярной цитогенетики как интегрированной части молекулярной диагностики, Jain K. (2015) указывает, что молекулярно-биологической основой персонализированной медицины является структурная вариабельность генома. Анализ геномного дисбаланса, обусловленного наличием вариаций количества копий ДНК (CNVs) и изучение ассоциации CNVs с теми или иными аномалиями развития, т.е. определение их клинической значимости, вносит существенный вклад в персонализированную медицину. Несмотря на многочисленные исследования, посвященные вопросам изучения структурной вариабельности генома (Feuk L., 2006; Miller D., 2010; Shaffer L.G., 2005, 2007; Liehr T., 2014), в настоящее время в России не существует научных работ, рассматривающих широкий аспект изучения структуры и спектра клинически значимых вариаций количества копий участков ДНК, а также роль комплексного методического подхода к их диагностике в пре- и постнатальном периодах онтогенеза.

Важнейшей проблемой медико-генетического консультирования является оценка повторного риска рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом, особенно при семейном носительстве хромосомных перестроек (VanDerwerken D., 2015). Определение индивидуального повторного риска рождения ребенка с несбалансированным кариотипом в таких семьях особенно актуально в контексте персонализированной медицины. В отличие от моногенных болезней, для которых можно рассчитать риск рождения больных детей, особенности мейотической сегрегации хромосомных перестроек и, в частности, аутомных реципрокных транслокаций, не позволяют применить простую математическую модель, позволяющую обеспечить точную оценку риска для носителей хромосомных перестроек (Young I., 2007). В связи с широким использованием инвазивной пренатальной цитогенетической диагностики незаслуженно забытыми оказались пионерские исследования, посвященные изучению сегрегационного поведения хромосом при ХА (Jalbert P. et al., 1980; Cohen O. et al., 1994). Поскольку любая инвазивная диагностическая процедура сопряжена с определенным риском прерывания беременности, на чаше весов оказывается сопоставимость рисков наличия хромосомного дисбаланса у плода и потери плода вследствие необоснованной

инвазивной процедуры. С получением информации о размерах цитогенетических бэндов при реализации проекта «Геном человека» поднимается вопрос о переоценке научно-методических подходов к сегрегационному анализу хромосомных перестроек и исследованию факторов, определяющих персонализированный подход к оценке их повторного риска.

Таким образом, изучение спектра ХА в пре- и постнатальном периодах онтогенеза, факторов, ассоциированных с патологической мейотической сегрегацией аутомсомных реципрокных транслокаций, а также разработка методических подходов, направленных на повышение эффективности диагностики хромосомных аномалий являются на сегодняшний день недостаточно изученными и исследования в этой области позволяют улучшить диагностическую и консультативную помощь беременным женщинам и пациентам с носительством ХА.

Цель исследования

Целью настоящего исследования являются разработка и научное обоснование комплексного подхода к профилактике и диагностике хромосомных болезней человека.

Задачи исследования

1. Оценить эффективность пренатальной цитогенетической диагностики в зависимости от показаний к ее назначению путем ретроспективного анализа за период 2001-2012 гг.
2. Провести анализ спектра хромосомных аномалий и предложить тактику обследования плодов с расширенной воротниковой зоной.
3. Определить эффективность диагностики и остаточный (резидуальный) риск клинически значимых и потенциально клинически значимых хромосомных аномалий при использовании методов ускоренной детекции анеуплоидии у плода в качестве альтернативы стандартному кариотипированию в разных группах беременных женщин.
4. Провести анализ показателей пренатальной селекции плодов у носителей аутомсомных реципрокных транслокаций и определить факторы, ассоциированные с риском рождения у них жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом.
5. Оценить роль и эффективность комплексного молекулярно-цитогенетического исследования в идентификации редких хромосомных аномалий.
6. Определить структуру геномного дисбаланса при субмикроскопических и микроскопических клинически значимых вариациях количества копий ДНК. Разработать протоколы комплексной молекулярно-цитогенетической диагностики редких хромосомных аномалий в постнатальном периоде онтогенеза.

Научная новизна исследования

Обнаружены смещение проведения пренатальной диагностики хромосомных болезней из II в I триместр беременности, снижение количества инвазивных диагностических процедур и достоверное увеличение частоты случаев пренатальной цитогенетической диагностики, выполненных по поводу расширенной воротниковой зоны у плода в специализированном пренатальном центре и рассчитана эффективность пренатального кариотипирования в группах беременных женщин с низким и высоким риском по хромосомным аномалиям у плода.

Впервые проведена оценка резидуального риска клинически значимых хромосомных аномалий у плода в I триместре беременности при использовании методов ускоренной детекции анеуплоидии в рамках программ неинвазивного пренатального скрининга. Определен спектр хромосомных аномалий, выявленных при проведении пренатальной цитогенетической диагностики в зависимости от показаний для назначения процедуры.

Впервые проведена количественная оценка размеров центрических и транслоцированных сегментов хромосом, длины отдельных хромосом, а также гаплоидной длины аутосом в 49 случаях семейного носительства аутосомных реципрокных транслокаций с использованием базы данных по геномной информатике. Для определения терминальности точек разрывов на дериватных хромосомах предложен количественный критерий (0,2 и менее размера соответствующего плеча хромосомы).

Впервые показано, что оценку жизнеспособности зигот, основанную на сопоставлении относительного размера несбалансированных хромосомных сегментов, необходимо учитывать при расчете повторного риска рождения ребенка с хромосомной патологией у носителей аутосомных реципрокных транслокаций.

Впервые установлено, что терминальность точек разрывов является независимым критерием при оценке вероятности рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом у носителей аутосомных реципрокных транслокаций, и шансы рождения такого ребенка в 6 раз выше при транслокациях, в которых хотя бы один из дериватов имеет терминальную точку разрыва.

Впервые показана необходимость определения механизма формирования клинически значимых субмикроскопических и микроскопических клинически значимых вариаций количества копий ДНК с использованием комплекса молекулярно-цитогенетических методов для оптимизации медико-генетического консультирования.

Научно-практическая значимость исследования

Результаты исследования, положения, выводы и предложения, содержащиеся в работе, являются концептуальной основой для совершенствования пренатальной, постнатальной и преимплантационной диагностики хромосомных аномалий, а также медико-генетического консультирования беременных женщин, пациентов и семей с носительством аутосомных реципрокных транслокаций.

Разработаны рекомендации по тактике ведения беременности при наличии в I триместре расширенной воротниковой зоны и нормальном кариотипе у плода. Предложен алгоритм пренатальной диагностики при альтернативном использовании методов ускоренной детекции анеуплоидии в группах беременных женщин с высоким и низким риском по анеуплоидии у плода.

Разработаны критерии оценки факторов, ассоциированных с патологической мейотической сегрегацией транслокационного квадριвалента у носителей аутосомных реципрокных транслокаций и принципы расчета повторного риска рождения жизнеспособного ребенка с хромосомной патологией у носителей аутосомных реципрокных транслокаций.

Разработаны алгоритмы (протоколы) молекулярно-цитогенетического обследования при: 1) несбалансированных хромосомных аномалиях, 2) малых сверхчисленных маркерных хромосомах, 3) субмикроскопических и микроскопических клинически значимых вариациях количества копий ДНК, выявленных при хромосомном микроматричном анализе.

Основные результаты работы и могут быть использованы для создания учебных пособий для ВУЗов, при обучении студентов медицинских и биологических специальностей, повышения квалификации врачей, в практической работе цитогенетических лабораторий медико-генетических консультаций России.

Положения, выносимые на защиту

1. Отмечается достоверно значимая тенденция к смещению проведения пренатальной диагностики хромосомных болезней из II в I триместр беременности. Доля диагностированных среди всех хромосомных аномалий случаев трисомии по хромосомам 13, 18 и 21 у плода составила 69,8%, причем на долю трисомии по

хромосоме 21 приходится 50,7% случаев. При общей тенденции к снижению количества инвазивных диагностических процедур, отмечается достоверно значимое увеличение частоты случаев пренатальной цитогенетической диагностики, выполненных по поводу расширенной воротниковой зоны у плода, что привело к повышению эффективности раннего выявления синдрома Дауна.

2. При расширенной > 95-го перцентиля нормативных для срока значений воротниковой зоны у плодов с трисомией по хромосомам 13, 18 21, моносомией X и структурными хромосомными аномалиями величина воротниковой зоны статистически достоверно выше, чем у плодов с нормальным кариотипом. Не обнаружено статистически достоверных различий в размере воротниковой зоны у плодов с триплоидией, дисомией по хромосоме Y и другими гоносомными анеуплоидиями, а также их мозаичными формами, что позволяет считать расширенную > 95-го перцентиля нормативных для срока значений воротниковую зону у плода эхографическим маркером как наиболее частых числовых, так и клинически значимых структурных хромосомных перестроек.

3. Суммарный резидуальный (остаточный) риск клинически значимых и потенциально клинически значимых хромосомных аномалий при использовании методов ускоренной детекции анеуплоидии в группе беременных женщин с высоким риском по анеуплоидии у плода не превышает 0,8%. Ускоренная детекция анеуплоидии у плода может быть использована в качестве альтернативы стандартному пренатальному кариотипированию при соблюдении определенного алгоритма мониторинга беременности.

4. При оценке повторного риска рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом у носителей аутомной реципрокной транслокации помимо эмпирического риска необходимо учитывать пахитенную конфигурацию квадριвалента, относительный размер хромосомного дисбаланса, потенциальную жизнеспособность зигот и терминальность точек разрыва на дериватных хромосомах.

5. Доказана необходимость комплексного молекулярно-цитогенетического подхода в каждом индивидуальном случае у пациентов с аномалиями фенотипа, обусловленными наличием микроскопических и субмикроскопических вариаций количества копий участков ДНК, а также присутствием в кариотипе малых схисленных маркерных хромосом.

Личный вклад автора в проведенные исследования

Автор принимал непосредственное участие в проведении стандартного пренатального и постнатального цитогенетического исследования, молекулярно-цитогенетического анализа (интерфазная и метафазная FISH, многоцветные технологии FISH), получении и обработке цифровых изображений FISH с использованием компьютерных программ. Автором лично разработан дизайн экспериментов и протоколов идентификации микроскопических и субмикроскопических CNVs, сформулированы идея, цели и задачи настоящего исследования. Автор лично проводил количественную оценку центрических и транслоцированных сегментов хромосом, задействованных в аутомных реципрокных транслокациях с расчетом относительного размера наблюдаемого и ожидаемого хромосомного дисбаланса при всех типах их патологической сегрегации, а также анализ пахитенных диаграмм, возможных типов патологической сегрегации в каждом отдельном случае реципрокной транслокации и факторов, ассоциированных с риском рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом. Автором самостоятельно проанализирована отечественная и зарубежная литература по теме диссертации, проведен статистический анализ данных, сформулированы результаты и выводы, а также лично написана рукопись настоящей работы.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует формуле специальности «03.02.07 – Генетика» (медицинские науки), охватывающей изучение проблем изменчивости и наследственности, закономерностей процессов хранения, передачи и реализации генетической информации на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Области исследования: «Молекулярные и цитологические основы наследственности»; «Геномные и хромосомные перестройки. Полиплоидия и анеуплоидия»; «Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни». Настоящая работа посвящена совершенствованию подходов к изучению хромосомных аномалий в рамках персонализированной медицины.

Апробация результатов исследования

Материалы диссертации доложены на: конференции «Актуальные вопросы цитогенетики» (Москва, 2007 г.), IV и V съездах медицинских генетиков Украины с международным участием (Львов, 2008 г., Донецк, 2012 г.), VI и VII съездах Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 2010 г., Санкт-Петербург, 2015 г.), IX и X научных конференциях «Генетика человека и патология» (Томск, 2011, 2014 гг.), V Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 25-летию лаборатории пренатальной диагностики ФГБУ «НИИ АГ им. Д.О. Отта» (Санкт-Петербург, 2012), VI, VII, VIII, IX и X международных конференциях Европейской цитогенетической ассоциации (ECA) (Стамбул, 2007 г., Стокгольм, 2009 г., Порто, 2011 г., Дублин, 2013 г., Страсбург, 2015 г.), международных конференциях Европейского общества генетики человека (ESHG) (Амстердам, 2006 г., Барселона, 2008, 2016 гг.).

Работа прошла экспертную комиссию и рекомендована к защите на заседании Ученого совета ФБГНУ «МГНЦ».

Публикации

По теме и материалам диссертации опубликовано 47 печатных работ, из них 25 - в научных рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК МОН РФ, получено 1 авторское свидетельство, изданы 4 методические рекомендации, 2 методических пособия, 1 учебно-методическое пособие и 1 глава в коллективной монографии.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 291 странице машинописного текста, содержит 33 таблицы, 70 иллюстраций и состоит из следующих разделов: оглавление, введение, 3 главы собственных исследований (каждая из которых включает обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключение, выводы, применение результатов и научных выводов, список условных сокращений, список работ, опубликованных автором по теме диссертации, список цитируемой литературы, приложение (5 таблиц). Библиографический указатель включает 401 источник до 2016 года включительно, из них 28 отечественных и 373 – зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования являлись образцы ворсин хориона (n=2 944) и пуповинной крови (n=2 816), полученные при проведении инвазивных диагностических процедур от 5 760 беременных женщин за период с 2001 по 2012 гг., периферической крови носителей аутомсомных реципрокных транслокаций (n=49), а также образцы периферической крови, полученные от 122 пациентов, которым проводилась уточняющая молекулярно-цитогенетическая диагностика по поводу: 1) выявления при стандартном цитогенетическом исследовании кариотипа 47, +mar (n=62);

2) верификации результатов ХМА у пациентов с аномальным фенотипом и нормальным кариотипом при стандартном цитогенетическом исследовании (n=21); 3) идентификации дополнительного хромосомного материала неизвестного происхождения (n=24). При подозрении на синдром Паллистера-Киллиана материалом для исследования также явились образцы буккального эпителия (n=15).

Для иммуноферментного анализа сывороточных маркеров в I и II триместрах использована сыворотка крови беременных женщин на сроке 10-13 недель и 6 дней и 16–21 неделя беременности соответственно (n=1 193).

Настоящее исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ».

Методы исследования

Ультразвуковое исследование плода экспертного уровня и инвазивные диагностические процедуры проводили в Центре пренатальной диагностики при клиническом родильном доме № 27 г. Москвы (заведующая – д.м.н., профессор Юдина Е.В.).

Концентрацию сывороточных маркеров в I триместре беременности (ПАПП-А и свободной молекулы β -ХГЧ) и во II триместре беременности (АФП и ХГЧ) определяли методом лантанидного флуоресцентного иммунного анализа с разрешением по времени на тест-системах Дельфия (Wallac, PerkinElmer) по стандартному протоколу, предусмотренному производителями тест-систем. Индивидуальный риск пациентки по СД у плода рассчитывался с использованием коммерческой программы “LifeCycle” (Wallac, PerkinElmer) версия 2.1. и программы “Прогноз” (лаборатория пренатальной диагностики ФГБУ «МГНЦ» РАМН).

Анализ кариотипа плода в I триместре беременности проводили при микроскопировании окрашенных красителем Гимза «прямых» и «полупрямых» препаратов из клеток ворсин хориона, полученных при трансабдоминальной АВХ. Приготовление препаратов из культуры лимфоцитов пуповинной крови, полученной после кордоцентеза и культуры лимфоцитов периферической крови, дифференциальное GTG-окрашивание метафазных хромосом проводилось по стандартным протоколам с модификациями, разработанными в ФГБНУ «МГНЦ» (Гинтер Е.К. и др., 2009). Кариотип указан в соответствии с международной цитогенетической номенклатурой (ISCN) (Shaffer L.G. et al., 2013).

Верификацию принадлежности полученной пуповинной крови плоду проводили методом электрофореза на ацетат-целлюлозных мембранах (Владипор, Россия) с использованием индикатора амидо черный по стандартному протоколу (Камышников В.С., 2009). Приготовление препаратов клеток из ткани хориона методом “отпечатков” и прямых однослойных препаратов из клеток буккального эпителия проводили по соответствующему протоколу (Козлова Ю.О. и др., 2012).

Длины центрических и транслоцированных сегментов хромосом, а также длины отдельных хромосом измерялись в миллионах пар нуклеотидов (млн.п.н.) в соответствии с положением о цитогенетических бэндах на физической карте генома человека (assembly 19) геномного браузера UCSC. Наблюдаемый и ожидаемый хромосомный дисбаланс в виде частичной трисомии и/или частичной моносомии при всех типах патологической сегрегации оценивался в % гаплоидной длины аутосом (%HAL) с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010.

Пример расчета %HAL для района 4q31-qter: $\frac{\text{длина } 4q31\text{-qter (м.п.н)}}{\text{длина хромосомы } 4(\text{м.п.н.})} \times \text{длина хромосомы } 4$ от длины всех аутосом (%) = $\frac{42,7}{191,2} \times 6,63 = 1,48\%$

Оценка пахитенных диаграмм и возможных типов патологической сегрегации в каждом отдельном случае аутосомной реципрокной транслокации проводилась по

стандартным критериям (Jalbert P. et al., 1980) при использовании программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010.

Для оценки жизнеспособности зигот при наблюдаемом и ожидаемом хромосомном дисбалансе (ХД) для каждой реципрокной транслокации использовали модели «размер ХД - выживаемость» (Chromosome Imbalance Size - Viability Model) и «поверхность жизнеспособных дисбалансов» (Surface of Viable Unbalances) (Daniel A., 1979; Cohen O. et al., 1994). Графические изображения строились с использованием компьютерной программы R версия 3.1.1 (<https://www.r-project.org>).

Идентификация специфических факторов, влияющих на риск рождения жизнеспособного ребенка с ХД при носительстве АРТ проводилась при логистическом регрессионном анализе (бинарная логистическая регрессия). Для статистической обработки данных использована статистическая среда R (<https://www.CRAN.R-project.org>) и пакеты для обработки данных (<https://cran.gis-lab.info>).

FISH проводили с набором ДНК-зондов «AneuVysion», с соответствующими локус-специфичными (LSI), прицентромерными (CEP), том числе, на центромерный район хромосомы 22(ХСЕ22), цельнохромосомными (WCP), частично окрашивающими (PCP), специфичными для коротких плеч акроцентрических хромосом (Acro-p), субтеломерными (Subtel) ДНК-зондами, мечеными различными флуорохромами по соответствующим протоколам фирм-производителей (Abbott Molecular, США; Kreatech, Нидерланды; MetaSystems, Германия).

Многоцветную FISH проводили с наборами mFISH (24XCyte- MetaSystems 24 color kit), mBAND (XCyte) для соответствующих хромосом, cenM-FISH (XCyting Centromere Multi-Color Probe Mix) (MetaSystems, Германия) по протоколам фирмы-производителя.

Денатурацию и гибридизацию проводили с использованием гибридизационной системы «ThermoBrite» (StatSpin, США) по протоколам фирмы-производителя. Анализ проводили на эпифлуоресцентном микроскопе «AxioImager M.1» (Carl Zeiss, Германия) с соответствующим набором светофильтров и использованием компьютерной программы обработки цифровых изображений «Isis» (MetaSystems, Германия).

Метафазная сравнительная геномная гибридизация (CGH) проводили по протоколу, разработанному в лаборатории цитогенетики ФГБНУ «МГНЦ» (Миньженкова М.Е. и др., 2013). Для анализа изображений метафазных хромосом использовали программу обработки изображения «LUCIA CGH», установленную в комплексе с эпифлуоресцентным микроскопом «Eclipse 90i» (Nikon) и CCD камерой «ProgRes MF» (Jenoptic).

Для ХМА использованы олигонуклеотидные микроматрицы высокой плотности CytoscanTM HD (Affymetrix[®], США), содержащие 2696550 маркеров (1953246 неполиморфных маркеров и 749157 SNPs). Все стадии лабораторного этапа анализа проводились в соответствии с протоколом производителя (Affymetrix[®], США).

Анализ полученных данных проводили с помощью программы Chromosome Analysis Suite (ChAS) (версия 2.0). Оценка патогенности обнаруженного ХД проводили с использованием баз данных OMIM, ISCA, DECIPHER и DGV. Молекулярный кариотип указан в соответствии с международной цитогенетической номенклатурой ISCN (Shaffer L. et al., 2013).

Оценку достоверности различий проводили по двухвыборочному t-критерию и U-критерию ранговых сумм (Манна-Уитни). Величина достигнутого уровня значимости (p) <0,05 считалась достоверной. Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы STATISTICA 6.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пренатальная диагностика хромосомных болезней

Ретроспективный анализ и оценка эффективности ПЦД хромосомных аномалий за период 2001-2012 гг

За период с 2001 по 2012 год пренатальная цитогенетическая диагностика (ПЦД) проведена в 5 670 случаях. Распределение инвазивных диагностических процедур в зависимости от показаний, характера инвазивной диагностической процедуры и частота ХА, выявленных у плода представлены в табл. 1.

Таблица 1. Показания для пренатального кариотипирования и частота ХА, выявленных у плода в зависимости от показания.

Показания для ПЦД	КЦ	АВХ	Всего ИДП	Кол –во ХА	Частота ХА (%)
Возраст беременной ≥ 35 лет	406	664	1070	37	3,5%
ЭГМ ХА, в т.ч. расширенная ВЗ в I триместре	1 409	684	2093 508	468	22,4%
Позитивный биохимический скрининг	792	401	1193	43	3,6%
Рождение ребенка с МВПР и/или ХА	107	219	326	7	2,1%
Семейное носительство ХА	60	38	98	32	32,7%
Прочие	42	938	980	11	1,1%
Итого	2 816	2 944	5 760	598	10,3%

За анализируемый период отмечается четкая тенденция к снижению количества инвазивных диагностических процедур (ИДП), в то время как частота выполненных аспираций ворсин хориона (АВХ) статистически достоверно значимо возросла с 48% до 69% ($t=4,71$, $p<0,001$), что свидетельствует о изменении с 2010 года пренатальной стратегии, направленной на как можно более раннюю диагностику ХА у плода. (рис. 1). Подобная тенденция увеличения относительного числа АВХ на фоне снижения общего количества ИДП характерна для ситуации, когда большинство беременных женщин, особенно в группе старше 30 лет, выбирают в качестве первичного обследования комбинированный скрининг I триместра беременности (Muller P. et al., 2007; Nakata N. et al., 2010). Однако если обратиться к динамике частоты ИДП, выполненных по поводу старшего возраста беременной и позитивных результатов материнского сывороточного скрининга, то отмечается тенденция к их снижению в течение исследуемого периода времени. При этом наблюдается одновременная статистически значимая тенденция к увеличению частоты процедур и ПЦД по поводу расширенной воротниковой зоны (ВЗ) в I триместре беременности ($t=3,12$, $p < 0,01$) (рис. 2).

Учитывая, что в 2010-2012 гг. около половины случаев ИДП проводились по поводу наличия у плода эхографических маркеров хромосомных аномалий (ЭГМ ХА), тенденция увеличения относительного числа АВХ на фоне снижения общего количества ИДП в нашей выборке обусловлена повышением относительного количества случаев ПЦД по поводу расширенной ВЗ в I триместре беременности.

При проведении ПЦД по различным показаниям ХА у плода были выявлены в 598 из 5 760 случаев (10,3%) (табл. 1). Частота выявления ХА варьировала в зависимости от показаний к проведению ПЦД и была закономерно высокой (32,7%) в группе беременных женщин, которым ПЦД проводилась по поводу носительства семейной хромосомной перестройки. При ПЦД по поводу старшего материнского возраста и положительных результатов материнского сывороточного скрининга частота ХА составила 3,5% и 3,6% соответственно. Частота ХА, выявленных у плода при наличии

ЭГМ ХА, составила 22,4%. Высокая эффективность выявления ХА у плода в этой группе указывает на то, что УЗИ плода играет очень важную роль в ПД ХА.

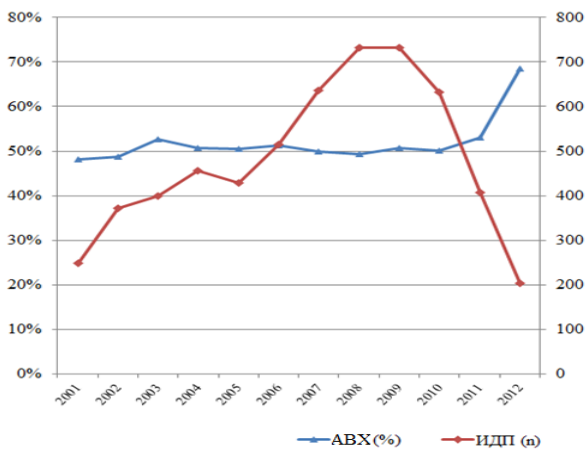


Рис. 1. Динамика распределения ИДП и частоты АВХ за период 2001-2012 гг.

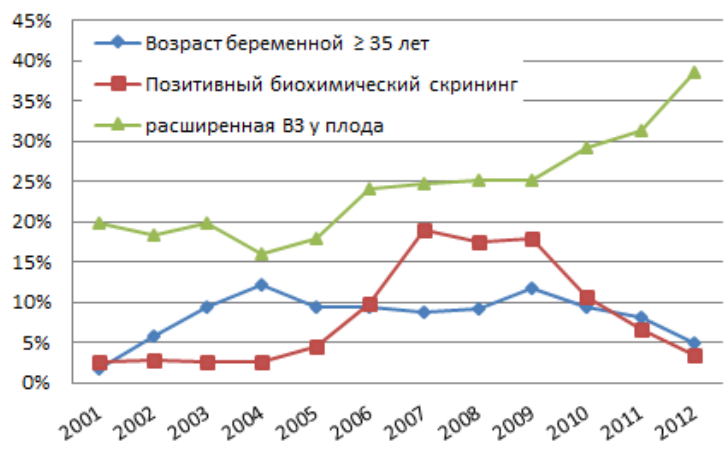


Рис. 2. Динамика относительного количества ИДП в группе беременных женщин с высоким риском по анеуплоидии у плода.

Наиболее часто диагностируемыми ХА являлись трисомии по хромосомам 13, 18 и 21, суммарная доля для которых составила 69,8% среди всех ХА, причем на долю трисомии 21 приходится более половины из этих случаев. Несбалансированный кариотип у плода был выявлен в 532 случаях (91,6%), сбалансированный кариотип – в 49 случаях (8,4%).

За исследуемый период времени отмечается тенденция к увеличению частоты ХА, выявленных пренатально по всем показаниям. При анализе динамики выявленных ХА по спектру также отмечается аналогичная тенденция повышения частоты диагностированных случаев трисомии 21 с 2001 по 2012 гг., при том, что эффективность диагностики других ХА оставалась довольно стабильной, что можно объяснить оптимизацией стратегии пренатального скрининга на анеуплоидии, сфокусированной в большей степени на детекцию синдрома Дауна у плода как основной клинически значимой ХА (рис. 3, 4).

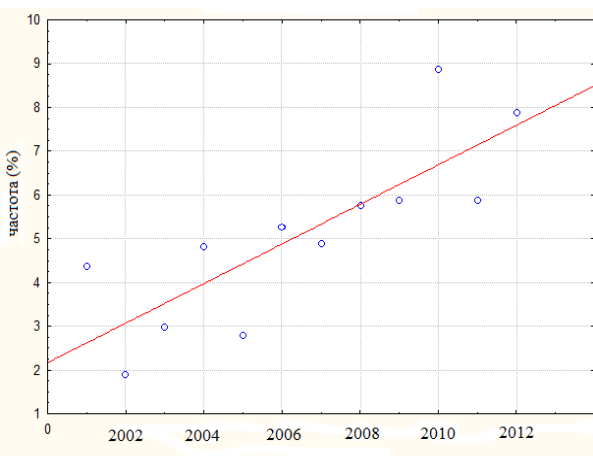


Рис. 3. Тенденция в пренатальной выявляемости трисомии по хромосоме 21.

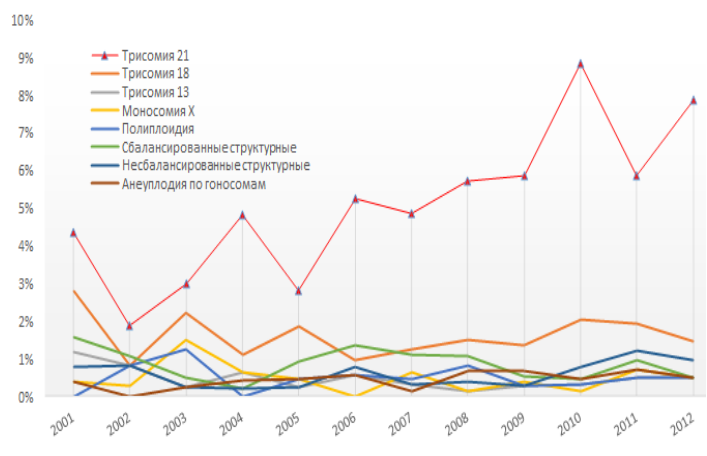


Рис. 4. Погодовое распределение частоты выявления ХА в зависимости от их спектра

Таким образом, в эволюции инвазивной пренатальной диагностики за 12-летний период (2001-2012 гг.) отмечается положительная тенденция к смещению проведения

ПЦД из второго в первый триместр беременности. При этом, несмотря на снижение количества диагностических процедур в целом, отмечается одновременное увеличение частоты случаев ПЦД, выполненных по поводу расширенной ВЗ у плода, что привело к повышению эффективности раннего выявления синдрома Дауна у плода.

Анализ спектра и распределения ХА, выявленных у плодов с расширенной воротниковой зоной

За период с 2001 по 2012 гг. ПЦД проведена в 508 случаях одноплодной беременности, при которых показанием к лабораторному исследованию плодного материала являлось обнаружение расширенной ВЗ у плода в качестве изолированного ЭГМ ХА в I триместре беременности. Критерием отбора пациенток на пренатальное кариотипирование являлось превышение размера ВЗ более 95-го перцентиля нормативных для срока значений. Средний материнский возраст составлял 31 год (ранг 18-45 лет), среднее значение величины ВЗ – 4,9 мм (ранг 2,4 - 12,0 мм).

При расширенной ВЗ более 95-го перцентиля нормативных для срока значений в 74,4% случаев (378/508) у плода диагностировали нормальный кариотип. ХА выявлены в 25,6% случаев (130/508) и представлены как числовыми, так и структурными хромосомными перестройками. ХД у плода обусловлен как геномными мутациями, которые составили 96,9% случаев (126/130) среди всех выявленных ХА, так и хромосомными мутациями вследствие структурных перестроек хромосом, на долю которых пришлось 3,1% случаев (4/130). Наиболее частой хромосомной патологией, выявляемой при изолированной расширенной ВЗ у плода в I триместре беременности, являлась трисомия по хромосоме 21, на долю которой приходилось 65,4% случаев. Частота ХА возрастала с увеличением размера ВЗ: с 13,2% при ВЗ между 95 перцентилем и 3,4 мм до 30,5% при ВЗ 3,5-4,4 мм, 56,5% при ВЗ 6,5-7,4 мм и т.д. У большинства плодов с трисомией 21 и полиплоидией толщина ВЗ оказалось менее, чем 4,5 мм, в то время как при трисомии 13 и 18, а также в случаях структурных ХА у большинства плодов толщина ВЗ варьировала от 5,5 до 8,4 мм, а при моносомии X – от 8,5 мм и более. Соответствующие медианы ВЗ представлены в табл. 2.

Таблица 2. Сравнительная оценка средних значений размера ВЗ у плодов с нормальным и аномальным кариотипом при расширенной ВЗ > 95-го перцентиля нормативных для срока значений.

	Среднее значение размера ВЗ (мм)	Медиана	Стандартное отклонение	U-критерий	Достигнутый уровень значимости (p)
Нормальный кариотип	3,58	3,20	1,15		
Трисомия 21	4,45	4,00	1,58	9619,500	< 0,0001
Трисомия 18	5,30	5,50	1,87	1382,500	< 0,0001
Трисомия 13	6,18	5,80	1,99	201,0000	< 0,005
Моносомия X	8,19	8,25	2,27	77,00000	< 0,0001
Триплоидия	4,47	4,50	0,85	209,0000	0,058
47,XYУ	3,25	3,25	0,35	375,5000	0,987
Анеуплоидии по гоносомам другие	4,05	3,85	1,05	479,0000	0,206
Структурные ХА	5,45	5,75	1,865	231,0000	< 0,05

Примечание: U - критерий ранговых сумм Манна-Уитни

Полученные данные подтверждают ассоциацию между расширенной ВЗ и трисомией 21 у плода, а также другими числовыми и структурными ХА, как установлено ранее (Nicolaides K., 2004). В настоящем исследовании показано, что ХА регистрируются

в 25,6% случаев при выявлении расширенной ВЗ в I триместре беременности. Такие данные могут быть следствием эффективного формирования группы высокого риска по ХА у плода в условиях проведения УЗИ плода экспертного уровня в специализированном центре. Сравнительная оценка средних размеров воротникового пространства у плодов с расширенной ВЗ >95-го перцентиля нормативных для срока значений показала, что при наличии структурных ХА отмечается статистически достоверное увеличение ВЗ по сравнению с таковой при нормальном кариотипе у плода (5,45 мм и 3,58 мм соответственно, $p < 0,05$).

Таким образом, расширение ВЗ более >95-го перцентиля нормативных для срока значений в сроке беременности 11-14 недель является эффективным ЭГМ ХА для формирования среди беременных женщин группы высокого риска не только по трисомии 21 у плода, но также по другим клинически и потенциально клинически значимым ХА. Учитывая, что ХД вследствие структурных хромосомных перестроек, как правило, сопровождается аномалиями и/или пороками развития у плода, в случаях выявления расширенной ВЗ > 95-го перцентиля нормативных для срока значений в сроке беременности 11-14 недель необходим динамический УЗИ-мониторинг. При обнаружении у плода ЭГМ ХА при проведении экспертного УЗИ во II триместре беременности необходимо проведение ПЦД с исследованием дифференциально окрашенных хромосом с целью выявления несбалансированных структурных ХА.

Оценка эффективности и резидуального (остаточного) риска выявления хромосомных аномалий у плода при ускоренной детекции анеуплоидии

Ускоренная диагностика анеуплоидии у плода при ПЦД в I триместре беременности

Среди 2 431 случая ПЦД, выполненной при исследовании препаратов из клеток ворсин хориона после АВХ в I триместре беременности, ускоренная (быстрая) детекция наиболее частых анеуплоидий (БДА) у плода методом FISH проведена в 8,1% случаев (196/2431). Поводами для проведения БДА явились невозможность стандартного цитогенетического исследования из-за отсутствия метафазных пластинок в препаратах из клеток цитотрофобласта, недостаточного для анализа количества метафазных пластинок (менее 7) или неудовлетворительной морфологии метафазных хромосом, а также уточнение цитогенетического диагноза с целью избежать повторной ИДП. В 164 случаях (84%) наиболее частые анеуплоидии у плода не обнаружены, в 32 случаях (16%) выявлены ХА у плода (табл. 3).

Из 164 случаев, когда анеуплоидия у плода не выявлена FISH-методом, в 157 случаях при УЗИ экспертного уровня во II триместре беременности у плодов не выявлены ЭГМ ХА и эти беременности закончились рождением фенотипически нормальных детей. В 6 случаях выявлены ЭГМ ХА при УЗИ во II триместре беременности. Из них в 5 случаях нормальный кариотип подтвержден при исследовании культуры лимфоцитов пуповинной крови, полученной при кордоцентезе.

В 1 случае произошло спонтанное прерывание беременности. В случае, когда у плода в I триместре беременности при проведении ПЦД по поводу расширенной ВЗ не удалось провести стандартное цитогенетическое исследование из-за отсутствия метафазных пластинок в препаратах из клеток цитотрофобласта, интерфазный FISH-анализ не выявил наиболее частые анеуплоидии. Тем не менее, даже при отсутствии ЭГМ ХА, проведена повторная ПЦД и при исследовании лимфоцитов пуповинной крови, полученной после кордоцентеза, в кариотипе плода выявлена кольцевая хромосома 13 - 46,XX,r(13)(p11q22). Следует отметить, что все клинически значимые ХА обнаружены при FISH-анализе у плодов беременных женщин группы «высокого риска» по хромосомной патологии у плода – наличие ЭГМ ХА, возраст, позитивный

биохимический скрининг на анеуплоидию, что позволило однозначно трактовать полученные данные о наличии анеуплоидии у плода. Поэтому, с учетом исхода беременности и результатов цитогенетического исследования лимфоцитов пуповинной крови, специфичность БДА методом FISH в I триместре беременности составила 100% (отсутствие ложно-положительных случаев) при чувствительности 99,5% (1 ложно-отрицательный случай).

Таблица 3. Результат БДА методом FISH с использованием ДНК-зондов на хромосомы 13, 18, 21, X и Y.

Показания к проведению ПЦД	Анеуплоидия не обнаружена	XA обнаружены				
		+ 21	+ 18	+13	X	Другие
Возраст беременной	60	1		1	1	
Позитивный биохимический скрининг	36	2				
Наличие ЭГМ XA у плода, в том числе:	17	13	3		6	4*
расширенная ВЗ	12	11	1		1	2**
Рождение ребенка с МВНР и/или XA	10					
Прочее	41					1***
Всего	164(84%)	32(16%)				

Примечание: * 69,XXX, XXY ** idic(Y)(DYZ3++), XXXXY *** X[34]/XY[56]

Таким образом, БДА с использованием интерфазного FISH-анализа на препаратах из клеток цитотрофобласта в случаях отсутствия, малого количества или неудовлетворительной морфологии хромосом в метафазной пластинке позволила избежать повторной инвазивной процедуры в 8% случаев. При малом числе метафазных пластинок (менее 7) FISH-анализ большого количества (100 и более) интерфазных ядер позволяет достоверно интерпретировать полученные при стандартном цитогенетическом исследовании результаты, а 100%-ная специфичность и 95,5%-ная чувствительность выявления XA свидетельствуют в пользу возможности самостоятельного, без стандартного кариотипирования, использования БДА в рамках неинвазивного пренатального скрининга на анеуплоидию в I триместре беременности.

Оценка резидуального (остаточного) риска XA в когорте беременных женщин с высоким риском по анеуплоидии у плода при использовании методов ускоренной детекции анеуплоидии

С целью оценки спектра и частоты XA, которые не могут быть диагностированы при применении таргетных методов БДА (FISH, КФ-ПЦР, MLPA) в I триместре беременности в качестве альтернативных стандартному пренатальному кариотипированию, проведен ретроспективный анализ результатов ПЦД, в группах беременных женщин с высоким риском по анеуплоидии у плода по показаниям материнский возраст 35 и более лет, позитивные результаты биохимического скрининга, а также расширенная более 95-го перцентиля ВЗ у плода. Результаты стандартного цитогенетического исследования, проведенного в 2 263 случаев ИДП по показаниям материнский возраст и позитивные результаты биохимического скрининга за период 2001-2012 гг. представлены в виде схемы на рисунке 5.

Как следует из приведенных данных рис. 5, клинически значимые, т.е. ассоциированные с задержкой умственного и физического развития, XA при проведении ПЦД по поводу старшего материнского возраста и положительного биохимического скрининга, регистрировались с частотой 1:1131 (2/2263), составляя 0,09% от всех случаев пренатального кариотипирования в этой группе высокого риска по анеуплоидии у плода.

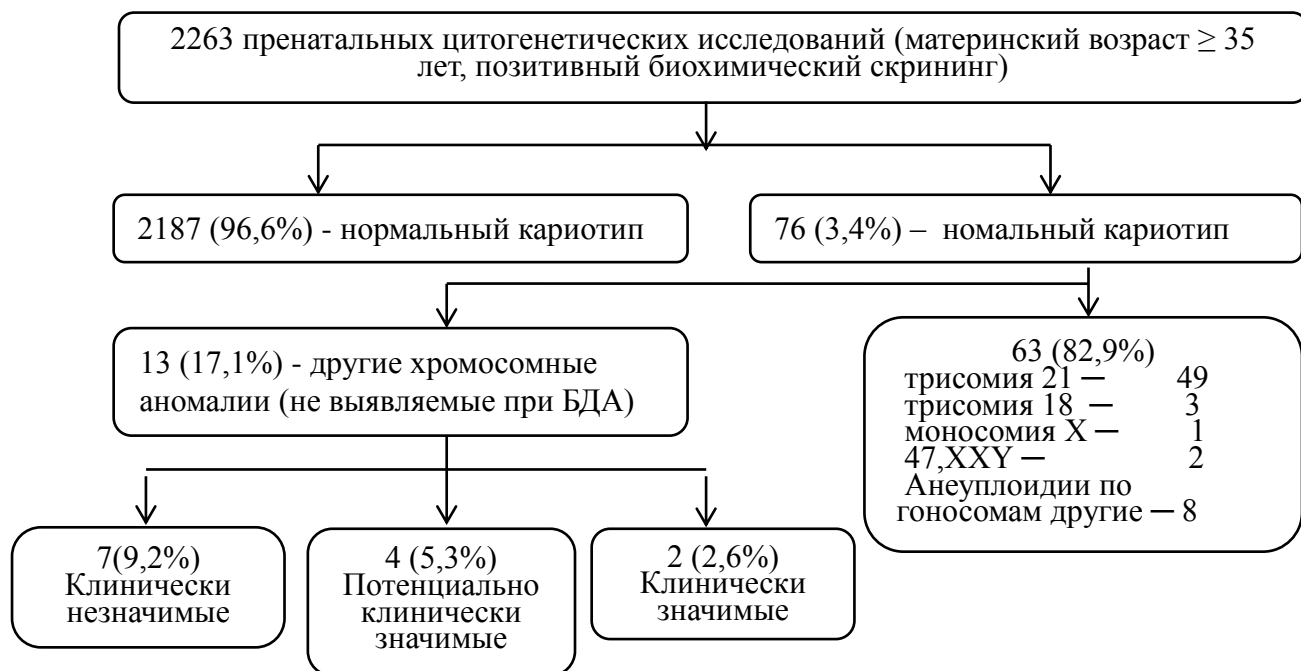


Рис. 5. Результаты стандартного пренатального кариотипирования, выполненного по показаниям старший возраст беременной и позитивный пренатальный биохимический скрининг на анеуплоидию.

Таким образом, при использовании методов БДА в данной группе в качестве альтернативных стандартному кариотипированию, клинически значимые ХА не были бы выявлены в 0,09% случаев (резидуальный риск). Потенциально клинически значимые ХА, т.е. сбалансированные хромосомные перестройки и малые сверхчисленные маркерные хромосомы (мСМХ), возникшие *de novo*, выявлены с частотой 1:566 (4/2263) случаев ПЦД в данной группе с резидуальным риском 0,2% при альтернативном использовании методов БДА. Клинически незначимые ХА, к которым относятся унаследованные от родителей структурные ХА и мСМХ, при стандартном пренатальном кариотипировании выявлены с частотой 1:323 (7/2263) с резидуальным риском 0,3% при проведении БДА. Суммарный резидуальный риск для клинически значимых и потенциально клинически значимых ХА, при условии использования методов БДА как альтернативных стандартному кариотипированию в группе беременных женщин с высоким риском по анеуплоидии у плода (материнский возраст 35 лет и более, положительный результат биохимического скрининга), составляет 0,29% при эффективности их выявления 99,7%.

Наличие расширенной ВЗ у плода является эффективным ЭГМ ХА для формирования среди беременных женщин группы высокого риска по анеуплоидии у плода в I триместре. Среди всех ХА, выявленных в этой группе, подавляющее большинство случаев (96,9%) представлено числовыми ХА, каждая из которых может быть выявлена при использовании методов БДА (рис. 6). Клинически значимые ХА, которые не могут быть выявлены методами БДА, при проведении ПЦД по поводу расширенной ВЗ у плода регистрировались с частотой 1:169 (3/508) случаев пренатального кариотипирования с резидуальным риском 0,6% при альтернативном использовании методов БДА, потенциально клинически значимые – с частотой 1:508 (1/508) случаев пренатального кариотипирования с резидуальным риском 0,2%.

Суммарный резидуальный риск для клинически значимых и потенциально клинически значимых ХА, при использовании методов БДА в качестве альтернативных стандартному кариотипированию, в группе беременных женщин с высоким риском по

анеуплоидии у плода (расширенная > 95-го перцентиля ВЗ у плода) составляет 0,8% при эффективности их выявления 99,2%.

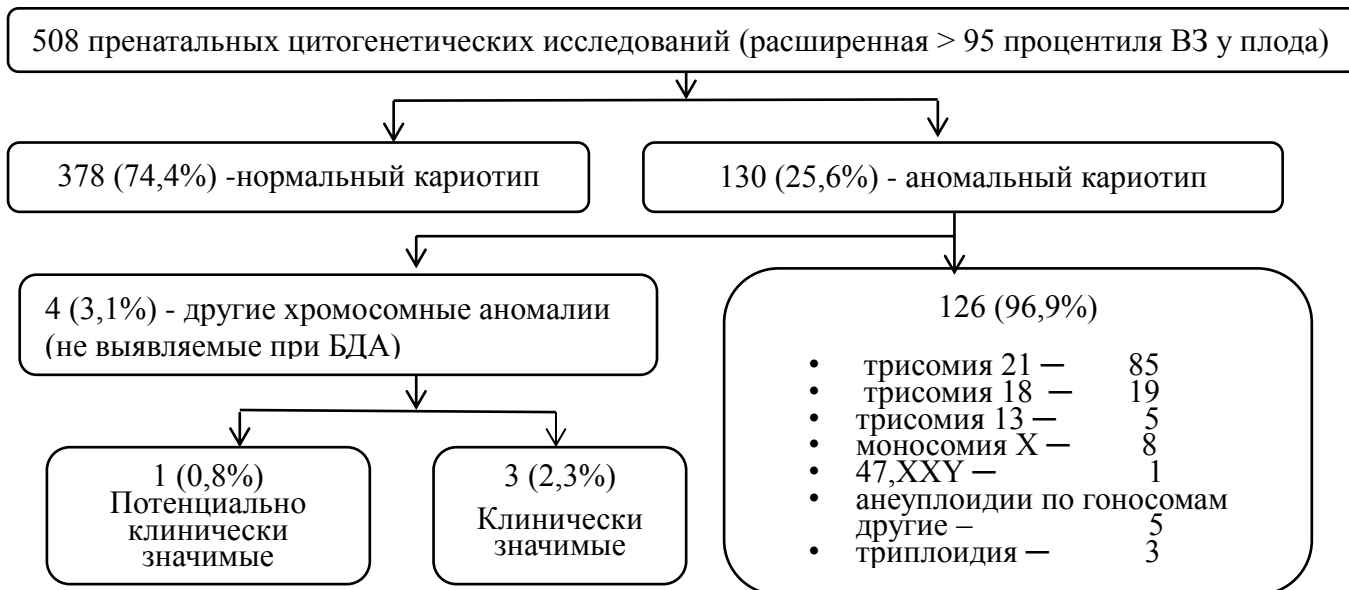


Рис. 6. Результаты стандартного пренатального кариотипирования, выполненного по показанию «расширенная ВЗ у плода».

Таким образом, при условии автономного использования методов БДА в сформированной в результате неинвазивного пренатального скрининга группе с высоким риском по анеуплоидии у плода эффективность выявления ХА составляет 99,2% при-расширенной >95-го перцентиля нормативных для срока значений ВЗ у плода и 99,7% при материнском возрасте старше 35 лет и позитивном биохимическом скрининге на анеуплоидию у плода, что сопоставимо с эффективностью выявления ХА при стандартном цитогенетическом исследовании клеток цитотрофобласта после АВХ, варьирующей по данным различных авторов от 97,5% до 99,6% (Lippman A. et al., 1992; Hahnemann J., Vejerslev L., 1997).

Оценка резидуального (остаточного) риска ХА в когорте беременных женщин с низким риском по анеуплоидии у плода при использовании ускоренной детекции анеуплоидии

Проведение ПЦД по поводу обеспокоенности будущих родителей хромосомным статусом плода не является классическим показанием для инвазивной цитогенетической диагностики. Тем не менее, в спектре показаний для ПЦД на долю так называемых «прочих» в настоящем исследовании приходится 17% случаев. Следует отметить, что в категорию показаний «прочие» были отнесены только беременные женщины моложе 35 лет. ПЦД по показаниям «прочие» проводилась в 980 случаях. В 969 случаях (98,9%) у плода диагностировали нормальный кариотип. ХА были выявлены в 1,1% случаев и представлены только числовыми аномалиями как в регулярной, так и мозаичной формах и также могли быть выявлены при использовании таргетных методов БДА. Хотя в настоящее время не существует убедительных данных, указывающих на более высокую частоту ХА в группе беременных женщин, обратившихся на инвазивную диагностику моногенных заболеваний, в клинической практике большинство супружеских пар – будущих родителей – выбирают одновременное проведение пренатальной цитогенетической диагностики как дополнительного теста для выявления (исключения) ХА у плода (Eason J., 2010). Однако возникает вопрос – так ли необходимо стандартное кариотипирование в случаях *a priori* низкого риска по ХА у плода? Предположив, что во всех случаях ПЦД, проводимой по показанию «прочие», лабораторная диагностика проводилась методом БДА, а не стандартным цитогенетическим анализом, все

клинически значимые ХА были бы диагностированы, т.е. эффективность выявления клинически значимых ХА в данной группе беременных женщин при автономном, без стандартного кариотипирования, использовании для ПЦД методов БДА составляет 100%. Таким образом, в когорте беременных женщин с низким риском по хромосомным анеуплоидиям рекомендуется использование методов БДА как самостоятельных, замещающих стандартное кариотипирование.

Сегрегация и пренатальная селекция аутомных реципрокных транслокаций

При анализе основных тенденций в пренатальной диагностике хромосомных болезней показано, что основная стратегия направлена на повышение эффективности ранней диагностики наиболее частой клинически значимой анеуплоидии у плода, а именно, трисомии по хромосомам 13, 18, 21 и моносомии по хромосоме X. Одновременно с этим отмечено, что частота выявления ХА является закономерно высокой (32,7%) в группе беременных женщин, которым ПЦД проводилась по поводу семейного носительства структурной хромосомной перестройки, в частности, аутомной реципрокной транслокации, что лишний раз подтверждает эффективность ПЦД при таком классическом показании к пренатальному кариотипированию. Выявление как сбалансированных, так и несбалансированных форм хромосомной аномалии у плода при установленном факте носительства аутомных реципрокных транслокаций и известном семейном анамнезе обусловило научный интерес и возможность анализа мейотической сегрегации аутомных реципрокных транслокаций, а также оценки факторов, ассоциированных с патологической сегрегацией и риском рождения детей с несбалансированным кариотипом, в каждом, индивидуальном случае реципрокной транслокации.

Пренатальная селекция при семейном носительстве аутомных реципрокных транслокаций

ПЦД проведена в 49 случаях при носительстве аутомной реципрокной транслокации (АРТ) одним из супругов (рис. 7).

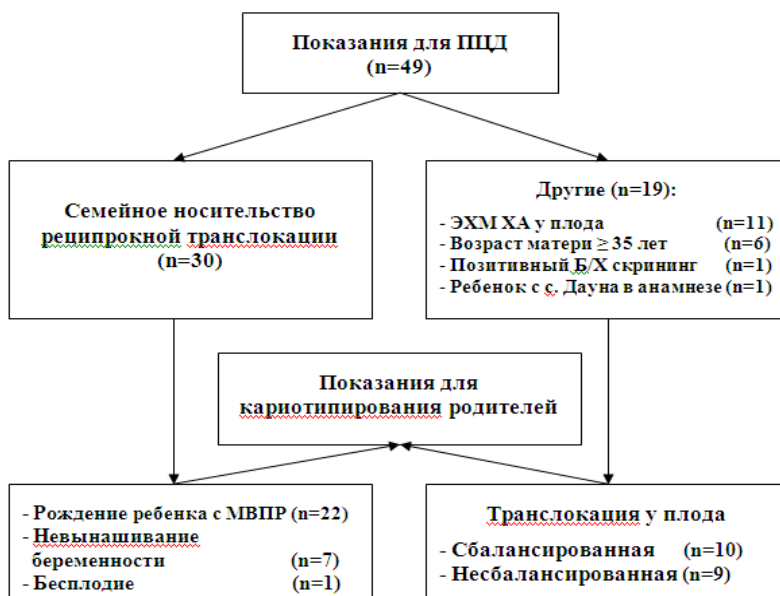


Рис. 7. Пренатальная цитогенетическая диагностика при носительстве АРТ и типы их регистрации.

Результаты пренатального цитогенетического исследования, кариотипы носителей АРТ, тип мейотической сегрегации и тип регистрации (повод для проведения цитогенетического исследования в семье) транслокации представлены в табл. 4.

Как видно из представленных данных, ПЦД проводилась в 49 семьях с носительством различных АРТ, причем в 2 случаях диагностика проводилась в одной семье дважды (случаи 32 и 36) и в обоих случаях кариотипы плодов при повторных беременностях отличались от предыдущих вследствие различных вариантов или типов мейотической сегрегации транслокации у родителя – носителя транслокации.

Таблица 4. Результаты ПЦД при носительстве семейных АРТ.

№	Кариотип плода	Кариотип носителя	Паттерн сегрегации	Тип регистрации
1	46,XY,t(1;2)(p22;p15)mat	46,XX,t(1;2)(p22;p15)	альт (сб.)	ПД
2	46,XY,t(1;5)(q44;p15.1)mat	46,XX,t(1;5)(q44;p15.1)	альт (сб)	МВПР*
3	46,XY,der(1)t(1;11)(q43;q21)pat	46,XY,t(1;11)(q43;q21)	совм-1	ПД
4	46,XX,der(1)t(1;11)(q44;p11.2)pat	46,XY,t(1;11)(q44;p11.2)	совм-1	ПД
5	46,XY,t(1;12)(p32;q24.2)mat	46,XX,t(1;12)(p32;q24.2)	альт (сб)	МВПР
6	46,XY,der(14)t(1;14)(q42;q32)mat	46,XX,t(1;14)(q42;q32)	совм-	МВПР
7	46,XY,t(2;3)(q21;p21)mat	46,XX,t(2;3)(q21;p21)	альт (сб.)	ПД
8	46,XX,t(2;4)(p25;q31)mat	46,XX,t(2;4)(p25;q31)	альт (сб.)	МВПР
9	46,XX,der(11)t(2;11)(p23.3;p15.5)pat	46,XY,t(2;11)(p23.3;p15.5)	совм-1	МВПР*
10	46,XX,t(2;21)(q34;q21)mat	46,XX,t(2;21)(q34;q21)	альт (сб.)	МВПР*
11	46,XY,t(3;4)(q13.2;q31.1)pat	46,XY,t(3;4)(q13.2;q31.1)	альт (сб.)	ПД
12	46,XX	46,XX,t(3;4)(q28;q31)	альт (норм.)	МВПР
13	46,XY	46,XY,t(3;12)(q25.1;p13.3)	альт (норм.)	МВПР*
14	46,XX,t(3;14)(q13.3;q23)mat	46,XX,t(3;14)(q13.3;q23)	альт (сб.)	ПД
15	46,XY	46,XX,t(4;5)(q31;p15.3)	альт (норм.)	МВПР*
16	46,XX	46,XX,t(4;19)(p15.2;p13.2)	альт (норм.)	МВПР
17	46,XX,t(4;22)(q23;q12)pat	46,XY,t(4;22)(q23;q12)	альт (сб.)	ПД
18	46,XX,t(5;6)(q14;p12.2)mat	46,XX,t(5;6)(q14;p12.2)	альт (сб)	ПД
19	46,XY	46,XY,t(5;6)(p15.1;p25.1)	альт (норм.)	МВПР*
20	46,XY,t(5;9)(q33;p22)mat	46,XX,t(5;9)(q33;p22)	альт (сб.)	СА-1
21	46,XY,der(5)t(5;10)(p14;p14)pat	46,XY,t(5;10)(p14;p14)	совм-1	ПД
22	46,XX,der(5)t(5;12)(p13.3;q21)mat	46,XX,t(5;12)(p13.3;q21)	совм-1	ПД
23	46,XY,t(5;15)(q31;q24)pat	46,XY,t(5;15)(q31;q24)	альт (сб.)	ПД
24	47,XXX,t(5;18)(q33;q22.3)mat	46,XX,t(5;18)(q33;q22.3)	альт (сб.)	ПД
25	46,XY	46,XY,t(5;20)(p12;q13.3)	альт (норм.)	МВПР*
26	46,XY,t(6;21)(q15;q21)mat	46,XX,t(6;21)(q15;q21)	альт (сб)	МВПР
27	46,XX,t(7;9)(p22;q22)mat	46,XX,t(7;9)(p22;q22)	альт (сб.)	СА -1, НБ - 1
28	46,XY,der(7)t(7;9)(q35;p13)mat	46,XX,t(7;9)(q35;p13)	совм-1	ПД
29	46,XX,t(7;14)(q31;q11)mat	46,XX,t(7;14)(q31;q11.1)	альт (сб.)	МВПР
30	46,XX,t(7;17)(p12;p11)mat	46,XX,t(7;17)(p12;p11)	альт (сб.)	МВПР
31	46,XX,t(8;9)(q22;q21.2)mat	46,XX,t(8;9)(q22;q21.2)	альт (сб.)	ПД
32	46,XY,t(8;10)(q22;p13)pat	46,XY,t(8;10)(q22;p13)	альт (сб.)	СА - 1
	46,XX		альт (норм.)	
33	46,XY	46,XY,t(8;11)(p23;q21)	альт (норм.)	МВПР
34	46,XX	46,XY,t(8;11)(q22;q14)	альт (норм.)	СА-4
35	46,XX,der(12)t(9;12)(p12;q24.3)mat	46,XX,t(9;12)(p12;q24.3)	совм-1	ПД
36	46,XY,+der(10)t(10;14)(q11.2;q13) mat,-14	46,XX,t(10;14)(q11.2;q13)	совм-2	СА-2, НБ -1
	46,XX		альт (норм.)	
37	46,XX,der(18)t(10;18)(q25.1;q23)mat	46,XX,t(10;18)(q25.1;q23)	совм-1	МВПР*
38	46,XX,der(18)t(10;18)(q26.2;p11.2)mat	46,XX,t(10;18)(q26.2;p11.2)	совм-1	МВПР*
39	46,XX	46,XY,t(11;13)(p13;q33)	альт (норм.)	СА-2
40	46,XX,der(11)t(11;18)(q25;q21)pat	46,XY,t(11;18)(q25;q21)	совм-1	ПД
41	46,XY,t(11;20)(q13.3;q13.1)pat	46,XY,t(11;20)(q13.3;q13.1)	альт (сб.)	Бесплодие 1
42	46,XX,t(11;20)(q23.3;p11.2)pat	46,XY,t(11;20)(q23.3;p11.2)	альт (сб)	МВПР
43	47,XY,+der(22)t(11;22)(q23.3;q11.2)mat	46,XX,t(11;22)(q23.3;q11.2)	3:1 с третичной трисомией	МВПР*

№	Кариотип плода	Кариотип носителя	Паттерн сегрегации	Тип регистрации
44	46,XY,t(11;22)(q23.3;q11.2)mat	46,XX,t(11;22)(q23.3;q11.2)	альт (сб.)	МВПР*
45	46,XX,+der(14)t(14;21)(q21;q21)pat,-21	46,XY,t(14;21)(q21;q21)	совм-2	ПД
46	46,XX,der(15)t(15;18)(q24;q21)mat/ 47,XX,der(15)t(15;18)(q24;q21)mat,+ i(12)(p10)	46,XX,t(15;18)(q24;q21)	совм-1	ПД
47	46,XX,t(15;20)(q11.1;p11.2)mat	46,XX,t(15;20)(q11.1;p11.2)	альт (сб.)	СА-3
48	46,XY,t(15;20)(q21;p12)mat	46,XX,t(15;20)(q21;p12)	альт (сб.)	ПД
49	46,XX,t(18;20)(q22.1;q11.2)pat	46,XY,t(18;20)(q22.1;q11.2)	альт (сб.)	МВПР

Примечание: альт (норм) – сегрегация по альтернативному типу с нормальным кариотипом; альт (сб) - сегрегация по альтернативному типу со сбалансированным кариотипом; совм-1 – патологическая сегрегация по совместному-1 типу; совм-2 – патологическая сегрегация по совместному-2 типу; МВПР – рождение ребенка с множественными врожденными пороками развития в анамнезе (* - хромосомный дисбаланс установлен); ПД – пренатальная диагностика; СА – спонтанный аборт; НБ – неразвивающаяся беременность. Выделены случаи с несбалансированным кариотипом у плода.

В 30 случаях носительство транслокации оказалось материнским, 19 случаях – отцовским. Среди 51 случая ПЦД в 36 случаях (70,6%) у плода был выявлен нормальный или сбалансированный кариотип вследствие альтернативного типа мейотической родительской сегрегации, причем сбалансированный кариотип диагностирован в 2 раза чаще, чем нормальный. 29,4% (15/51) плодов имели несбалансированный кариотип вследствие патологической сегрегации в гаметогенезе родителя - носителя транслокации, среди которых в 12 случаях ХД у плода обусловлен совместным-1 типом сегрегации, в 2 случаях – совместным-2 типом сегрегации и в 1 случае – сегрегацией 3:1 с третичной трисомией. Таким образом, в собственной выборке АРТ отмечается явная тенденция к преимущественной пренатальной селекции зигот вследствие альтернативного, непатологического, типа сегрегации. Подобная тенденция установлена при анализе паттерна мейотической сегрегации у носителей транслокаций при исследовании сперматоцитов, а также при оценке хромосомного статуса эмбрионов при проведении преимплантационной генетической диагностики при использовании молекулярно-цитогенетических методов исследования, что, в целом, отражает тенденцию к расхождению гомологичных центромер к противоположным полюсам при клеточном делении (Vozdova M.et al., 2013; Zhang Y.et al., 2014).

Оценка вариантов патологической сегрегации, жизнеспособности зигот и эмпирического повторного риска рождения детей с несбалансированным кариотипом при анализе случаев носительства сбалансированных аутомсомных транслокаций, в которых проводилась ПЦД

Характеристика мейотических квадрилвалентов

Патологическая сегрегация, приводящая к наименьшему ХД может быть оценена при анализе пахитенных диаграмм и определении количественных характеристик квадрилвалента. Сегрегация мейотического квадрилвалента ассоциирована с некоторыми специфическими особенностями транслокации, такими как размер транслоцированного сегмента, терминальность точек разрыва, присутствие центромер акроцентрических хромосом в центре транслокационного креста геометрическая форма квадрилвалента, а именно степень его асимметрии (Lim C. et al., 2008; Ye Y. et al., 2012; Zhang Y. et al., 2014).

Характеристики рассматриваемых в настоящем исследовании (табл. 5) 49 АРТ по терминальности точек разрывов и степени асимметрии квадрилвалента, рассчитанные по определенным количественным критериям (Ye Y. et al., 2012; Zhang Y. et al., 2014).

Таблица 5. Характеристика 49 реципрокных транслокаций по степени асимметрии квадриллента и локализации точек разрывов

№ п/п	Реципрокная транслокация	ТС1	ТС2	Max TC/ minTC	ЦС1	ЦС2	Max ЦС/ minЦС	Степень асимметрии квадриллента	Длина плеча 1	ТС1/ длина плеча 1	Длина плеча 2	ТС2/ длина плеча 2	Терминальные точки разрывов
1	t(1;2)(p22;p15)mat	88,4	61,3	1,4	160,9	181,9	1,1	умеренная	125,0	0,71	93,3	0,66	—
2	t(1;5)(q44;p15.1)mat	2,9	15	5,2	246,4	165,9	1,5	умеренная	124,3	0,02	48,4	0,31	+
3	t(1;11)(q43;q21)pat	5,6	37,8	6,8	243,7	97,2	2,5	сильная	124,3	0,05	81,3	0,46	+
4	t(1;11)(q44;p11.2)pat	2,9	43,5	15,0	246,4	91,5	2,7	сильная	124,3	0,02	53,7	0,81	+
5	t(1;12)(p32;q24.2)mat	56,1	15,8	3,6	193,2	118,1	1,6	умеренная	125,0	0,45	98,1	0,16	+
6	t(1;14)(q42;q32)mat	18,6	5,9	3,2	230,7	101,4	2,3	сильная	124,3	0,15	89,7	0,07	+
7	t(2;3)(q21;p21)mat	108,1	44,2	2,4	135,1	153,8	1,1	умеренная	150,0	0,72	91,0	0,49	—
8	t(2;4)(p25;q31)mat	12,2	42,7	3,5	231	148,5	1,6	умеренная	93,3	0,13	140,8	0,30	+
9	t(2;11)(p23.3;p15.5)pat	24	2,8	8,6	219,2	132,2	1,7	умеренная	93,3	0,26	53,7	0,05	+
10	t(2;21)(q34;q21)mat	27,9	21,3	1,3	215,3	24	9,0	умеренная	150,0	0,19	34,9	0,61	+
11	t(3;4)(q13.2;q31.1)pat	84,5	49,7	1,7	113,5	141,5	1,2	умеренная	107,0	0,79	140,8	0,35	—
12	t(3;4)(q28;q31)mat	10,1	42,7	4,2	187,9	148,5	1,3	умеренная	107,0	0,09	140,8	0,30	+
13	t(3;12)(q25.1;p13.3)pat	45,9	10,1	4,5	152,1	123,8	1,2	умеренная	107,0	0,43	35,8	0,28	—
14	t(3;14)(q13.3;q23)mat	79	42,5	1,9	119	62,1	1,9	умеренная	107,0	0,74	89,7	0,47	—
15	t(4;5)(q31;p15.3)mat	44,4	4,5	9,9	146,8	176,4	1,2	умеренная	140,8	0,32	48,4	0,09	+
16	t(4;19)(p15.2;p13.2)mat	21,3	6,9	3,1	169,9	52,2	3,3	сильная	50,4	0,42	26,5	0,26	—
17	t(4;22)(q23;q12)pat	90,1	21,7	4,2	101,1	29,6	3,4	сильная	140,8	0,64	14,7	1,48	—
18	t(5;6)(q14;p12.2)mat	98,1	51,8	1,9	82,8	119,3	1,4	умеренная	132,5	0,74	61,0	0,85	—
19	t(5;6)(p15.1;p25.1)pat	15	4,2	3,6	165,9	166,9	1,0	умеренная	48,4	0,31	61,0	0,07	+
20	t(5;9)(q33;p22)mat	25,2	16,6	1,5	155,7	124,6	1,2	умеренная	132,5	0,19	49,0	0,34	+
21	t(5;10)(p14;p14)pat	23,3	12,2	1,9	157,6	123,3	1,3	умеренная	48,4	0,48	40,2	0,30	—
22	t(5;12)(p13.3;q21)mat	28,9	47,2	1,6	152	86,7	1,8	умеренная	48,4	0,60	98,1	0,48	—
23	t(5;15)(q31;q24)pat	41,4	27,3	1,5	139,5	75,2	1,9	умеренная	132,5	0,31	83,5	0,33	—
24	t(5;18)(q33;q22.3)mat	25,2	5	5,0	155,7	73,1	2,1	сильная	132,5	0,19	60,9	0,08	+
25	t(5;20)(p12;q13.3)pat	42,5	16,6	2,6	138,4	46,4	3,0	сильная	48,4	0,88	35,5	0,47	—
26	t(6;21)(q15;q21)mat	83,1	24,1	3,4	88	24	3,7	сильная	110,1	0,75	34,9	0,69	—
27	t(7;9)(p22;q22)mat	7,3	44,6	6,1	151,8	96,6	1,6	умеренная	59,9	0,12	92,2	0,48	+
28	t(7;9)(q35;p13)mat	11,2	36,3	3,2	147,9	104,9	1,4	умеренная	99,2	0,11	49,0	0,74	+

№ п/п	Реципрокная транслокация	ТС1	ТС2	Max TC/ minTC	ЦС1	ЦС2	Max ЦС/ minЦС	Степень асимметрии квадριвалента	Длина плеча 1	ТС1/ длина плеча 1	Длина плеча 2	ТС2/ длина плеча 2	Герминальные точки разрывов
29	t(7;14)(q31;q11.1)mat	35,3	88,2	2,5	123,8	19,1	6,5	сильная	99,2	0,36	89,7	0,98	—
30	t(7;17)(p12;p11)mat	50,5	24	2,1	108,6	57,2	1,9	умеренная	59,9	0,84	24,0	1,00	—
31	t(8;9)(q22;q21.2)mat	44,8	60,1	1,3	101,6	81,1	1,3	умеренная	100,8	0,44	92,2	0,65	—
32	t(8;10)(q22;p13)pat	44,8	12,2	3,7	101,6	123,3	1,2	умеренная	100,8	0,44	40,2	0,30	—
33	t(8;11)(p23;q21)pat	6,2	37,8	6,1	140,2	97,2	1,4	умеренная	45,6	0,14	81,3	0,46	+
34	t(8;11)(q22;q14)pat	44,8	46,7	1,0	101,6	88,3	1,2	умеренная	100,8	0,44	81,3	0,57	—
35	t(9;12)(p12;q24.3)mat	41	8	5,1	100,2	125,9	1,3	умеренная	49,0	0,84	98,1	0,08	+
36	t(10;14)(q11.2;q13)mat	89,4	70,7	1,3	46,1	36,6	1,3	умеренная	95,3	0,94	89,7	0,79	—
37	t(10;18)(q25.1;q23)mat	23,6	2,5	9,4	111,9	75,6	1,5	умеренная	95,3	0,25	60,9	0,04	+
38	t(10;18)(q26.2;p11.2)mat	4,9	8,5	1,7	130,6	69,6	1,9	умеренная	95,3	0,05	17,2	0,49	+
39	t(11;13)(p13;q33)pat	31	8,2	3,8	104	107	1,0	сильная	53,7	0,58	97,3	0,08	+
40	t(11;18)(q25;q21)pat	4,2	21,9	5,2	130,8	56,2	2,3	сильная	81,3	0,05	60,9	0,36	+
41	t(11;20)(q13.3;q13.1)pat	64,6	16,6	3,9	70,4	46,4	1,5	умеренная	81,3	0,79	35,5	0,47	—
42	t(11;20)(q23.3;p11.2)pat	13,8	21,3	1,5	121,2	41,7	2,9	умеренная	81,3	0,17	35,5	0,60	+
43	t(11;22)(q23.3;q11.2)mat	13,8	27,8	2,0	121,2	23,5	5,2	сильная	81,3	0,17	14,7	1,89	+
44	t(11;22)(q23.3;q11.2)mat	13,8	27,8	2,0	121,2	23,5	5,2	сильная	81,3	0,17	14,7	1,89	+
45	t(14;21)(q21;q21)pat	63,8	24,1	2,6	43,5	24	1,8	умеренная	89,7	0,71	34,9	0,69	—
46	t(15;18)(q24;q21)mat	27,3	21,9	1,2	75,2	56,2	1,3	умеренная	83,5	0,33	60,9	0,36	—
47	t(15;20)(q11.1;p11.2)mat	83,5	21,3	3,9	19	41,7	2,2	сильная	83,5	1,00	27,5	0,77	—
48	t(15;20)(q21;p12)mat	49,6	9,2	5,4	52,9	53,8	1,0	умеренная	83,5	0,59	27,5	0,33	—
49	t(18;20)(q22.1;q11.2)pat	11,3	28,6	2,5	66,8	34,4	1,9	умеренная	60,9	0,19	35,5	0,81	+

Примечание: ЦС1 – длина центрического сегмента 1 (млн.п.н.); ЦС2 – длина центрического сегмента 2 (млн.п.н.); ТС1 – длина транслоцированного сегмента 1(млн.п.н.); ТС2 – длина транслоцированного сегмента 2 (млн.п.н.)

Оценка типов патологической сегрегации аутосомных реципрокных транслокаций, приводящих к наименьшему хромосомному дисбалансу

Риски формирования зигот с ХД у носителей АРТ значительно варьируют от транслокации к транслокации. Эти риски будут зависеть от наиболее вероятного для каждой конкретной транслокации типа патологической сегрегации, приводящей к формированию несбалансированных гамет и вероятной жизнеспособности несбалансированных зигот, эмбрионов, плодов или новорожденных (Armstrong S et al., 2000). В свою очередь, эти вероятности зависят от хромосом, вовлеченных в транслокацию, и размеров центрического и транслоцированного сегментов.

В каждом из 49 случаев выявленных АРТ проведена сравнительная оценка предполагаемой и наблюдаемой патологической сегрегации. Ключевыми количественными характеристиками являлись: соотношения суммарных длин ЦС и ТС, соотношение длин минимального ЦС и максимального ТС, соотношение длин минимального ЦС и минимального ТС, участие в транслокации акроцентрических хромосом и хромосомы 9, а также сравнительное отношение длин обоих ЦС к длине короткого плеча хромосомы 9 без учета размера прицентромерного гетерохроматина (Jalbert P. et al., 1980; Cans C. et al., 1993).

Установлено, что для подавляющего большинства транслокаций характерна совместная-1 патологическая сегрегация. Во всех случаях, когда был известен факт регистрации случаев с несбалансированным кариотипом в семье, ожидаемая патологическая сегрегация соответствовала наблюдаемой, приводящей к определенному ХД. В случаях 26, 36, 45 и 47 (в соответствии с нумерацией в табл. 4) пахитенная диаграмма имела характеристики, характерные как для 2:2 (совместный-2 тип), так и 3:1 сегрегации. Действительно, в случаях 36 и 45 наблюдаемый ХД был обусловлен совместным-2 типом патологической сегрегации. В случае 47 не было зарегистрировано факта рождения ребенка или беременности плодом с несбалансированным кариотипом. В случае 26 в семье родился ребенок с МВПР, но, к сожалению, он не был кариотипирован. Тем не менее, показано, что при таком сочетании ожидаемых типов сегрегации, отмечается преимущественная селекция зигот вследствие патологической совместной-2 сегрегации (Ogilvie C., Scriven P., 2002).

Обращает на себя внимание случай 29 - $t(7;14)(q31;q11.1)$. Это единственная реципрокная транслокация, у которой сумма ЦС равна сумме ТС. По этому формальному признаку оценки пахитенной диаграммы мы не можем определить наиболее вероятный тип патологической сегрегации. Конфигурация квадривалента очень необычная: квадривалент сильно асимметричный, точки разрывов не терминальны (табл. 5). Данная реципрокная транслокация характеризуется наличием очень короткого ЦС и присутствием центромерного гетерохроматина в центре квадривалента (рис. 8). Такие цитогенетические характеристики негативно влияют на рекомбинацию, поскольку образование хиазмы затруднено в центральном регионе транслокационного креста, представленного гетерохроматиновыми районами акроцентрических хромосом (Anton E. et al., 2008).

Если учесть, что среднее число хиазм, происходящих в одном хромосомном сегменте определяется как отношение «длина сегмента (млн.п.н.)/50» (Faraut T. et al., 2000), то вероятность кроссинговера в коротких сегментах крайне мала, а в районах прицентромерного гетерохроматина равна 0. Без рекомбинации в этих районах хромосом невозможно поддержание конфигурации квадривалента после профазы I (Petronczki M. et al., 2003) и хромосомы будут вступать в метафазу I мейоза как два независимых бивалента с последующей сегрегацией по альтернативному или совместному-1 типам с равновероятным соотношением сбалансированных и несбалансированных гамет и,

следовательно, высоким риском (50%) последующего формирования зигот с хромосомным дисбалансом. Действительно, анализ образцов спермы, полученных от мужчин-носителей реципрокных транслокаций, показал, что при транслокациях с подобными характеристиками сегрегация происходит с преимущественным формированием гамет по альтернативному (около 55%) и совместному (около 45%) типам (Brugnon F. et al., 2006; Anton E. et al., 2008).

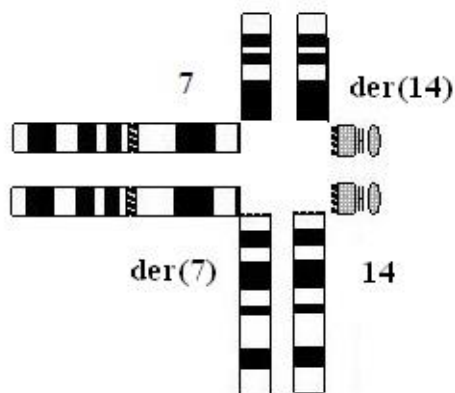


Рис. 8. Мейотический квадрилвалент при t (7;14).

Примечание: В центре квадрилвалента – короткие плечи и прицентромерный гетерохроматин длинного плеча хромосомы 14.

Оценка жизнеспособности зигот с хромосомным дисбалансом

Оценка жизнеспособности как плодов с выявленным ХД, так и потенциальных зигот с наиболее вероятным дисбалансом вследствие патологической сегрегации для каждой транслокации проводилась с использованием классической модели «размер ХД - выживаемость» и «поверхность жизнеспособных дисбалансов», основанной на измерении хромосомных сегментов дистальнее точек разрывов и определении относительного размера ХД (Daniel A., 1979; Cohen O. et al., 1994).

Случаи наблюдаемого ХД у плода и оценка жизнеспособности при данном дисбалансе представлены в табл. 6 и на рис. 9 («треугольник выживаемости» ограничен линией, соединяющей значения 4% по оси y и 2% по оси x; «поверхность жизнеспособных дисбалансов» представляет область, выделенную серым цветом).

Таблица 6. Размер наблюдаемого хромосомного дисбаланса в 15 случаях несбалансированного кариотипа у плода вследствие патологической сегрегации родительских аутосомных реципрокных транслокаций.

№ п/п	Кариотип плода	%HAL трисомия	%HAL моносомия
1	46,XY,der(1)t(1;11)(q43;q21)pat	1,31	0,19
2	46,XX,der(1)t(1;11)(q44;p11.2)pat	1,51	0,10
3	46,XY,der(14)t(1;14)(q42;q32)mat	0,65	0,20
4	46,XX,der(11)t(2;11)(p23.3;p15.5)pat	0,83	0,10
5	46,XY,der(5)t(5;10)(p14;p14)pat	0,42	0,81
6	46,XX,der(5)t(5;12)(p13.3;q21)mat	1,64	1,00
7	46,XY,der(7)t(7;9)(q35;p13)mat	1,26	0,39
8	46,XX,der(12)t(9;12)(p12;q24.3)	1,42	0,28
9	46,XY,+der(10)t(10;14)(q11.2;q13) mat,-14	1,60	1,27
10	46,XX,der(18)t(10;18)(q25.1;q23)mat	0,82	0,09
11	46,XX,der(18)t(10;18)(q26.2;p11.2)mat	0,17	0,30
12	46,XX,der(11)t(11;18)(q25;q21)pat	0,76	0,15
13	47,XY,+der(22)t(11;22)(q23.3;q11.2)mat	1,29	0,00
14	46,XX,+der(14)t(14;21)(q21;q21)pat,-21	1,51	0,83
15	46,XX,der(15)t(15;18)(q24;q21)mat	0,76	0,95

Во всех случаях наблюдаемого ХД у плода относительный размер этого дисбаланса укладывался в область «выживаемости», что свидетельствует об *in utero*

жизнеспособности плодов вплоть до их рождения. Наблюдаемый ХД у плода вследствие патологической сегрегации родительской транслокации во всех этих случаях соответствовал ожидаемому и его относительный размер был наименьшим из всех возможных вариантов такой сегрегации.

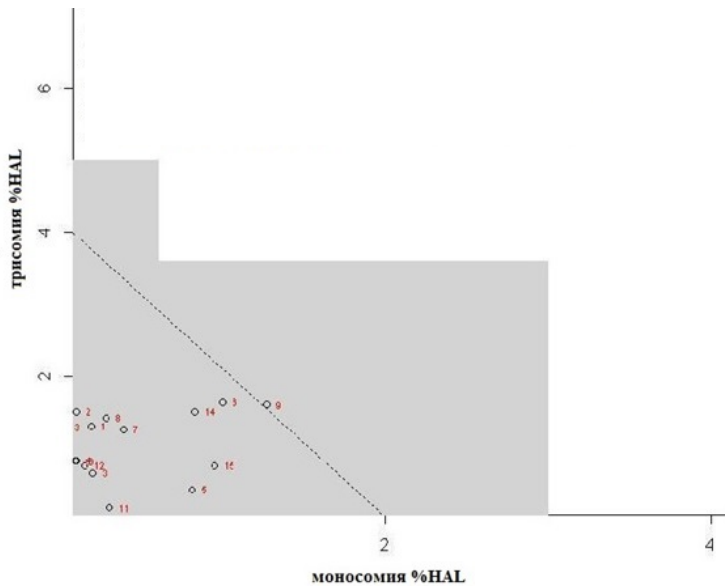


Рис. 9. Распределение относительного размера наблюдаемого хромосомного дисбаланса у 15 плодов с несбалансированным кариотипом

Значения всех случаев ХД (% NAL) в зависимости от типа сегрегации были нанесены на графики, объединяющие две модели – «треугольник выживаемости» и «поверхность жизнеспособных дисбалансов». При анализе графиков «выживаемости», построенных для 8 базовых вариантов сегрегации каждой из 49 транслокаций установлено, что в случае $t(2;3)(q21;p21)$ (№ 7 в табл. 4) ни в одном из вариантов сегрегации зиготы не будет жизнеспособными. Квадривалент является умеренно симметричным, а транслокация характеризуется как не имеющая терминальных точек разрывов с предпочтительной сегрегацией по совместному-1 типу (табл. 5, рис. 10).

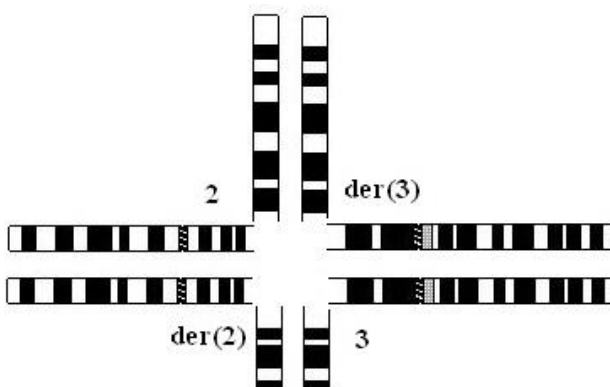


Рис. 10. Мейотический квадривалент при $t(2;3)(q21;p21)$.

По данным Anton E. с соавт. (2008) у мужчин-носителей АРТ, при которых формируется мейотический квадривалент с подобной характеристикой, отмечается высокая частота гамет вследствие альтернативной и совместной-1 сегрегации ($44,9 \pm 2,5\%$ и $36,5 \pm 1,9\%$ соответственно). Однако, при оценке жизнеспособности зигот, оказалось, что при данной транслокации зиготы, сформированные вследствие патологической совместной-1 сегрегации, являющейся предпочтительной, нежизнеспособны. Действительно, транслокация у 27-летней женщины-носителя выявлена случайно при проведении ПЦД в 1 зарегистрированной беременности по поводу обнаружения при УЗИ плода мягкого эхографического признака – гиперэхогенного образования в легком плода. Беременность закончилась рождением здорового ребенка. Не исключено, что у

женщины имели место случаи нераспознанной беременности с ранней элиминацией нежизнеспособных зигот.

Таким образом, любая беременность у женщины - носительницы этой транслокации при сегрегации по альтернативному типу будет заканчиваться рождением ребенка с нормальным или сбалансированным кариотипом; при патологической сегрегации – все зиготы нежизнеспособны. Следовательно, в данном случае проведение ПЦД нецелесообразно, поскольку риск прерывания беременности вследствие инвазивной процедуры превышает риск рождения больного ребенка.

Оценка выживаемости зигот при возможных вариантах сегрегации в случаях носительства транслокаций, при которых были зарегистрированы спонтанные аборт и неразвивающиеся беременности, показала, что практически во всех случаях, могут формироваться жизнеспособные зиготы и измерение относительных размеров несбалансированных сегментов хромосом не может быть отличительным предиктором индивидуального риска рождения ребенка с хромосомным дисбалансом.

При данных АРТ не было зарегистрировано случаев рождения детей с МВПР вследствие хромосомного дисбаланса; все они сопровождались либо рождением ребенка с нормальным фенотипом, либо повторными спонтанными абортами. Однако очень показательным является случай 36 (табл. 4), когда транслокация между хромосомами 10 и 14 установлена по поводу нескольких случаев прерывания беременности, что позволяет считать повторный риск низким. Тем не менее, в очередной, четвертой по счету, беременности при ПЦД у плода выявили ХД вследствие патологической совместной-2 сегрегации. Совершенно очевидно, что имеют место другие факторы, оказывающие влияние на жизнеспособность зигот, например, высокий уровень мозаицизма и его экстремальной формы - хаотицизма, что свидетельствует о предрасположенности к постзиготическим ошибкам расхождения хромосом, задействованных в транслокации, приводящим к гибели эмбрионов (Xanthopoulou L. et al., 2010).

Оценка жизнеспособности зигот, основанная на сопоставлении относительного размера несбалансированных хромосомных сегментов, может быть дополнительным этапом при оценке повторного риска рождения ребенка с хромосомной патологией при семейном носительстве АРТ. В случаях АРТ, которые сегрегируют с образованием гамет, из которых возможно формирование только нежизнеспособных зигот, ПЦД не является целесообразной. Этот факт является особенно важным в современных условиях отчетливой тенденции снижения толерантности к любым пренатальным потерям, в том числе и вследствие проведения инвазивной диагностической процедуры (Allyse M. et al., 2015). Если формирование жизнеспособных зигот возможно хотя бы в одном из ожидаемых вариантов патологической сегрегации АРТ, независимо от типа ее регистрации, вопрос о ПЦД должен обсуждаться при оценке риска рождения ребенка с ХД.

Оценка эмпирического повторного риска рождения жизнеспособного ребенка при семейном носительстве аутомных реципрокных транслокаций

Оценить значения эмпирического повторного риска рождения жизнеспособного ребенка при семейном носительстве аутомных реципрокных транслокаций на основании литературных данных оказалось возможным только в 45 случаях. В зависимости от величины эмпирического риска рождения ребенка с хромосомным дисбалансом все анализируемые АРТ были сгруппированы по принципу, предложенному Stengel-Rutkowsky S. с соавт. (1988): нет риска, с низким риском (до 5%), со средним риском (5-10%) и с высоким риском (>10%). Так, в 11 случаях (24,4%) не имеется риска рождения ребенка с ХД вследствие патологической сегрегации

родительской АРТ; в 25 случаях (55,6%) этот риск оценивается как низкий, в 6 случаях (13,3%) – как средний и только в 3 случаях (6,7%) – как высокий (рис. 11).

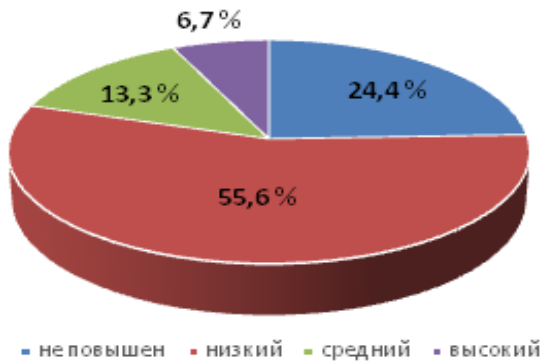


Рис. 11. Эмпирический риск рождения жизнеспособного потомства с хромосомным дисбалансом.

Таким образом, в подавляющем большинстве случаев (80%) риск рождения жизнеспособного ребенка с НД вследствие патологической сегрегации АРТ расценивается как не повышенный или низкий, что согласуется с данными других авторов (Midro A., 2008; Aguilar J et al., 2011).

Оценка эмпирического повторного риска в 31 случае при наличии МВПР у ребенка (плода) с учетом случайного выявления ХД при проведении ПЦД показала, что в 16,1% случаев (5/31) риск не повышен, в 48,4% случаев (15/31) является низким, в 25,8% случаев (8/31) – средним, в 9,7% случаев (3/31) высоким. В 14 случаях транслокаций, при семейном носительстве которых не было зарегистрировано рождения детей с МВПР и/или ХД, такой риск оценивается как нулевой в 28,6% случаев (4/14), как низкий – в 57,1% случаев (8/14), как средний – в 7,15% случаев (1/14) и как высокий также в 7,15% случаев (1/14). Сравнительные диаграммы значений эмпирического риска при семейном носительстве АРТ в зависимости от типа их регистрации представлены на рис. 12.

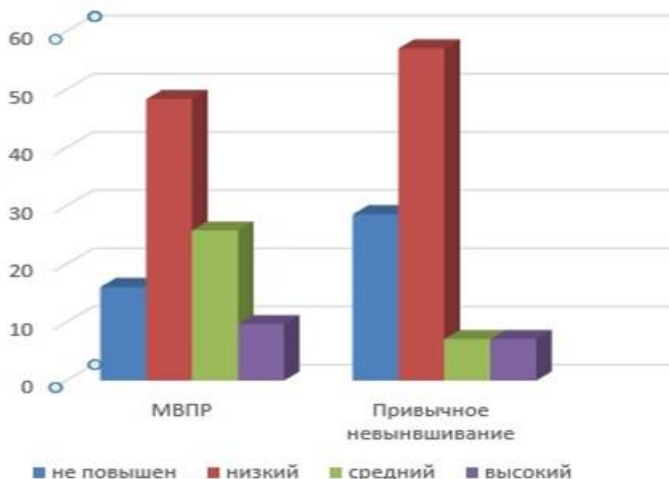


Рис. 12. Эмпирический риск при семейном носительстве АРТ в зависимости от типа их регистрации.

Как следует из представленных данных, в обеих группах, как при наличии факта хромосомного дисбаланса у потомков, так и при его отсутствии, отмечаются транслокации с различными рисками, при этом в первой группе частота транслокаций со средним и высоким риском оказалась в 2,5 раза выше, чем во второй. Эти данные подтверждают тот факт, что, хотя и отмечается тенденция низкого повторного риска рождения жизнеспособного ребенка при семейном носительстве АРТ, зарегистрированных по поводу привычного невынашивания беременности, эмпирический риск не может быть использован как единственный и решающий фактор

при оценке повторного риска. Так, например, в случае 47 (табл. 4), когда $t(15;20)(q11.1;p11.2)$ материнского происхождения была зарегистрирована по поводу трех спонтанных аборт и при ПЦД в четвертой беременности у плода выявлен нормальный кариотип, можно было предположить *a priori* низкий риск рождения жизнеспособного ребенка с несбалансированным кариотипом. Тем не менее, эмпирический риск в данном случае является высоким (10,3%) что подтверждается фактом формирования жизнеспособных зигот при потенциально возможной патологической сегрегации. С другой стороны, некоторые транслокации, зарегистрированные по поводу МВПР у ребенка (плода) и имеющие *a priori* средний и высокий риски, актуально оцениваются как транслокации, не имеющие эмпирического риска.

Также показательным является случай 29 (табл. 4) - $46,XX,t(7;14)(q31;q11.1)$, который уже рассматривался ранее. Если подходить к формальной оценке риска рождения ребенка с несбалансированным кариотипом, то на основании популяционных данных он определяется как низкий (0,4%), что противоречит теоретическим и эмпирическим данным сегрегационного поведения квадриллента, определяющего высокий риск формирования зигот с ХД.

Таким образом, поскольку факты рождения детей с несбалансированным кариотипом отмечаются в семьях с различными априорными рисками, в тех случаях, когда эмпирический риск для носителей конкретной реципрокной транслокации рассчитан как низкий, необходимо обсуждать вопрос о проведении пренатальной диагностики в последующих беременностях при совокупной оценке всех факторов, влияющих на сегрегационное поведение мейотического квадриллента (Pourjafari B. et al., 2012).

Регрессионный анализ для оценки риска хромосомного дисбаланса при семейном носительстве аутомомных реципрокных транслокаций

Оценка повторного риска того или иного генетического заболевания является краеугольным камнем медико-генетического консультирования. Поскольку подавляющее большинство АРТ являются уникальными, этот факт крайне ограничивает оценку эмпирического риска повторного рождения детей с ХД, так как таких данных попросту не существует, и значительно осложняет медико-генетическое консультирование семей, в которых один из супругов является носителем АРТ. Поэтому разработка методов оценки риска ХД при АРТ с использованием статистических моделей является крайне актуальной.

Для оценки факторов, ассоциированных с риском рождения жизнеспособного ребенка с ХД, был использован метод бинарной логистической регрессии, позволяющий исследовать зависимость дихотомических (бинарных) переменных от независимых переменных (предикторов) и предсказать значения бинарной зависимой переменной по набору независимых переменных. Дихотомической (бинарной) переменной, определяющей бинарный исход, являлся статус потомка носителя АРТ: 1 – жизнеспособный ребенок с МВПР и/или установленным ХД, 0 – нежизнеспособный плод/ребенок или ребенок с нормальным фенотипом. В качестве независимых переменных (предикторов) были выбраны следующие характеристики транслокации, оказывающие влияние на мейотическое поведение квадриллента и выживаемость зигот: 1- пол носителя транслокации женский; 2 - на транслоцированных сегментах преобладают G-позитивные бэнды; 3 - в транслокации задействована хромосома 9; 4 - в транслокации задействованы акроцентрические хромосомы (13-15, 21 и 22); 5 - квадриллент сильно асимметричен; 6 - хотя бы одна из точек разрывов является терминальной (соотношение длин ТС к размерам плеча хромосом, вовлеченных в

транслокацию, выраженных в млн.п.н., менее 0,2). Результаты регрессионного анализа для каждого предиктора представлены в табл. 7.

Таблица 7. Исследование взаимосвязи между характеристиками АРТ и рождением жизнеспособного ребенка с МВПР и/или хромосомным дисбалансом (логит-модель 1).

Предикторы	Оценка параметра	Стандартная ошибка	Хи-квадрат Вальда	Достигнутый уровень значимости
Пересечение (свободный член)	-0,1672	0,7858	-0,2130	0,8315
R 1	0,6592	0,7981	0,8260	0,4088
R 2	-0,3976	0,7930	-0,5010	0,6161
R 3	-0,4238	0,8333	-0,5090	0,6110
R 4	-2,4772	1,3206	-1,8760	0,0607
R 5	0,5819	0,8996	0,6470	0,5177
R 6	2,1987	0,8921	2,4650	0,0137
Информационный критерий Акаике	63,365			

По значениям статистической ошибки первого рода (p) для коэффициентов регрессии можно видеть, что статистически значимым, т.е. независимо связанным с риском рождения жизнеспособного ребенка с МВПР и/или ХД, является только один из предикторов, а именно терминальность точек разрывов, ($p=0,01$). Статистически значимой связи между риском рождения жизнеспособного ребенка с МВПР и/или ХД и полом носителя транслокации, обогащенностью транслоцированных сегментов генами, вовлеченностью в транслокацию акроцентрических хромосом и хромосомы 9, а также степенью асимметрии квадριвалента не выявлено, т.е. эти предикторы не вносят значимого вклада в настоящую модель логистической регрессии.

Такое заключение позволило сформировать еще одну модель логистической регрессии (логит-модель 2) с включением только статистически значимого предиктора – терминальность точек разрывов (таблица 8). В данной модели статистическая значимость данного предиктора возрастает ($p=0,007$).

Таблица 8. Исследование взаимосвязи между терминальностью точек разрывов в АРТ и рождением жизнеспособного ребенка с МВПР и/или хромосомным дисбалансом (логит-модель 2)

Предикторы	Оценка параметра	Стандартная ошибка	Хи-квадрат Вальда	Достигнутый уровень значимости
Пересечение (свободный член)	-0,1671	0,4097	-0,408	0,68344
Точки разрывов являются терминальными	1,8253	0,6822	2,675	0,00746
Информационный критерий Акаике	59,088			

Для сравнения альтернативных моделей с разным числом параметров, когда требуется выбрать наилучший набор независимых переменных, используется информационный критерий Акаике. Чем меньше этот критерий, тем лучше модель (Шипунов А.Б. и др., 2012). Как видно из данных табл. 7 и 8, логит-модель 2 является более предпочтительной, поскольку имеет меньший критерий Акаике.

Для оценки общей значимости логит-моделей было проведено сравнение отклонений остатков обеих логит-моделей между собой и с отклонением нулевой модели по критерию хи-квадрат с использованием теста ANOVA (однофакторный дисперсионный анализ - Analysis Of Variance) (таблица 9). Как видно из представленных

данных, логит-модель 2 статистически значимо лучше, чем нулевая модель, т.е. модель без независимых переменных, ($p < 0,005$). Незначимая величина критерия хи-квадрат ($p = 0,33$) свидетельствует о том, что сокращенная модель с одной независимой переменной (логит-модель 2) соответствует данным также хорошо, как и модель, созданная на основе 6 независимых переменных (логит-модель 1) и ее использование является целесообразным.

Таблица 9. Оценка общей значимости логит-модели 1 и логит-модели 2 по критерию хи-квадрат.

	Нулевая модель, Логит-модель 1	Нулевая модель, Логит-модель 2	Логит-модель 1, Логит-модель 2
Отклонение остатков	63.262, 49.365	63.262, 55.088	49.365, 55.088
Значения хи-квадрат	13.897	8.1743	5.7228
Уровень значимости (p)	0.03081	0.004249	0.3341

Отношение шансов для логит-модели 2, в которой статистически значимым предиктором является терминальность точек разрывов на хромосомах, вовлеченных в АРТ, представлено в табл. 10.

Как следует из представленных в таблице данных, шансы рождения жизнеспособного ребенка с МВПР и/или ХД возрастают в 6 раз при носительстве аутомных реципрокных транслокаций, в которых хотя бы один из дериватов имеет терминальную точку разрыва. Наблюдаемая зависимость является статистически значимой, так как 95% доверительный интервал не включает 1, а значения его нижней и верхней границ больше 1.

Таблица 10. Регрессионные коэффициенты и отношение шансов для логит-модели 2

Предикторы	Коэффициент регрессии	Отношение шансов	95% доверительный интервал для отношения шансов
Пересечение (свободный член)	-0,1671	—	—
Точки разрывов являются терминальными	1,8253	6,2045	(1,63;23,63)

Таким образом, меньший информационный критерий Акаике и достигнутый уровень значимости логит-модели 2 позволяют считать фактор терминальности точек разрывов независимо связанным с риском рождения жизнеспособного ребенка с МВПР и/или ХД. Шансы рождения такого ребенка в 6 раз выше при носительстве АРТ в которых хотя бы один из дериватов имеет терминальную точку разрыва (0,2 и менее размера соответствующего плеча хромосомы) по сравнению с АРТ, в которых точки разрывов не являются терминальными.

Хромосомные аномалии, вариации количества копий участков ДНК (CNVs) и их диагностика в постнатальном периоде онтогенеза

Постнатальная цитогенетическая диагностика ХА отличается от таковой в пренатальном периоде онтогенеза. С одной стороны, задача исследователей несколько облегчается, поскольку визуализация аномального фенотипа пациента позволяет заподозрить наличие у него хромосомную этиологию патологических изменений фенотипа, особенно в случаях синдромальных форм ХБ. С другой стороны, в отличие от ПЦД, основной задачей которой является как можно более ранняя диагностика наиболее

частой анеуплоидии у плода, постнатальная цитогенетика сфокусирована в основном на диагностику широкого спектра структурных аномалий. Значительное разнообразие структурных хромосомных перестроек, варибельность их размеров создает определенные трудности их идентификации при стандартном цитогенетическом исследовании и требует разработки комплексного подхода с использованием высокоразрешающих методов анализа, таких как FISH и молекулярное кариотипирование.

Молекулярно-цитогенетическая характеристика мСМХ

Малые сверхчисленные маркерные хромосомы (мСМХ) – это морфологически и генетически гетерогенная группа дополнительных структурно аномальных хромосом, равных по размеру или меньших, чем хромосома 20 в той же метафазной пластинке, которые не могут быть однозначно идентифицированы при стандартном цитогенетическом исследовании с использованием GTG-окрашивания хромосом (Liehr T. et al., 2004). Очень долгое время, до развития молекулярно-цитогенетических методов исследования, эти хромосомы оставались не идентифицированными и их роль в формировании аномального фенотипа оставалась неясной. В настоящем исследовании при комплексном молекулярно-цитогенетическом подходе определены происхождение и генетическая структура 62 случаев аутосомных мСМХ, выявленных, но не идентифицированных при стандартном цитогенетическом исследовании - кариотип 47,+mar. Спектр мСМХ, в зависимости от их молекулярно-цитогенетических характеристик, представлен на рис. 13.

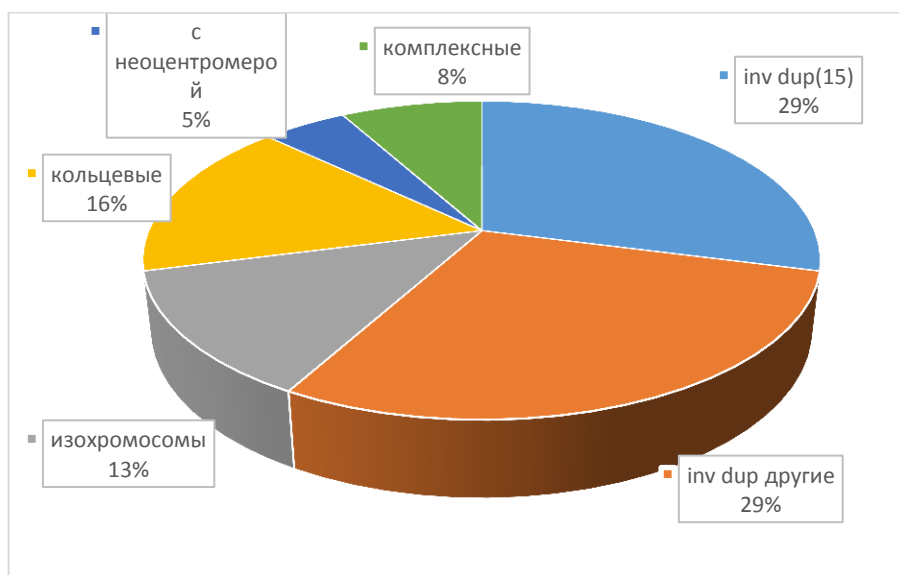


Рис. 13. Спектр мСМХ, идентифицированных при молекулярно-цитогенетическом исследовании.

мСМХ – производные акроцентрических хромосом

В 58% случаев мСМХ являлись производными акроцентрических хромосом в виде инвертированных дупликаций, из которых половина случаев (29%) приходится на мСМХ - производные хромосомы 15 - inv dup(15). В 4 из 18 случаев эти мСМХ содержали эухроматиновые районы 15q12-q13 и у всех этих пациентов отмечалась задержка психомоторного развития и аномалии фенотипа, в то время как в остальных случаях мСМХ без эухроматиновых районов пациенты не имели отклонений ни в физическом, ни в психическом развитии и поводом для кариотипирования являлось наличие репродуктивных проблем, в основном – бесплодие. Молекулярно-цитогенетические варианты inv dup (15) мСМХ представлены на рис. 14.

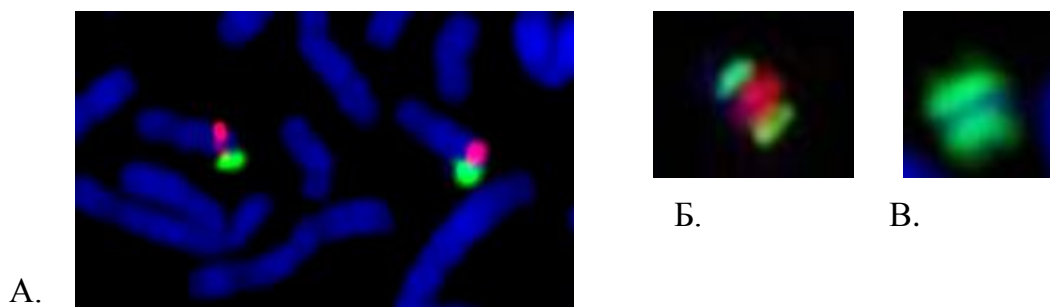


Рис. 14. Результат гибридизации с CEP 15 SpGreen/ D15S10 SpOrange ДНК-зондом: А. – нормальные гомологи хромосомы 15; Б. – *inv dup(15)* мСМХ содержит эухроматиновый район q12- q13; В. - *inv dup(15)* мСМХ содержит только гетерохроматин короткого плеча хромосомы 15.

Распределение 29% идентифицированных случаев *inv dup* мСМХ – производных других акроцентрических хромосом представлено на рис. 15.

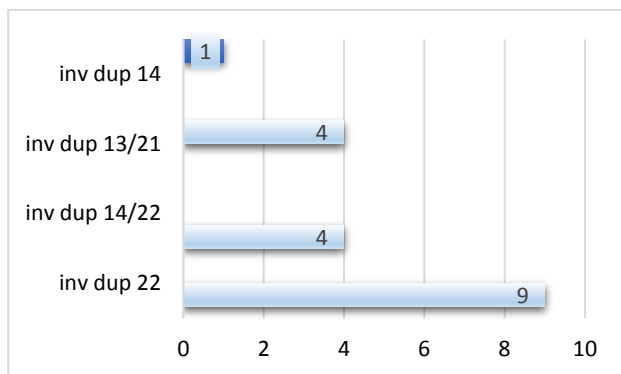


Рис. 15. Распределение *inv dup* мСМХ в зависимости от их хромосомного происхождения.

В большинстве случаев эта группа оказалась представлена мСМХ – производными хромосом 14 и 22. За исключением 5 случаев *inv dup(22)(q11)* - синдром частичной тетрасомии хромосомы 22 (синдром «кошачьего глаза») (ОМIM #115470) - у остальных пациентов при наличии в кариотипе мСМХ – производных акроцентрических хромосом (кроме хромосомы 15) - аномалии фенотипа не отмечены.

мСМХ – производные неacroцентрических хромосом

Производные неacroцентрических хромосом и комплексные мСМХ идентифицированы 42% случаях, при этом 13% случаев приходится на долю мСМХ в виде изохромосом, подавляющее большинство из которых (7/8) представлено ОМIM-аннотированной синдромальной формой мСМХ – синдромом тетрасомии 18p (синдром изохромосомы 18p) (ОМIM #614290).

Кольцевые мСМХ идентифицированы в 16% случаев среди всех мСМХ и представляют довольно гетерогенную группу. ХД проявляется в виде частичной трисомии как по короткому, так и по длинному плечу соответствующей хромосомы. Клинические проявления, связанные с наличием в кариотипе кольцевых хромосом неспецифичны или отсутствуют. Так, у пациентов с минутными кольцевыми мСМХ не отмечались задержка психомоторного и физического развития. Показаниями для проведения стандартного цитогенетического исследования, при котором были выявлены мСМХ, являлись либо эндокринологические проблемы, либо нарушение репродуктивной функции (табл. 11).

Отсутствие фенотипического эффекта в виде нарушения психомоторного и физического развития при наличии в кариотипе такого рода мСМХ у пациентов можно

объяснить толерантностью организма к геномному дисбалансу по прицентромерным районам этих хромосом (Liehr T., 2012).

Таблица 11. Кольцевые мСМХ у пациентов без аномалий фенотипа.

№	Показания к кариотипированию	Кариотип	мСМХ
1	Гинекомастия	47,XY,+mar	min r(16)
2	Ожирение, гипогонадизм	47,XY,+mar	min r(16)
3	Гипогонадизм	mos 47,XY,+mar [20]/46,XY [50]	min r(16)
4	Гипогонадизм	mos 47,XY,+mar [13]/46,XY [6]	min r(1)
5	Вторичная аменорея	mos 47,XX,+mar[5]/46,X[25]	min r(4)
6	Нарушение репродукции	mos 47,XX,+mar [35]/46,XX[10]	min r(8)

Некоторые случаи минутных кольцевых мСМХ представлены на рис. 16.

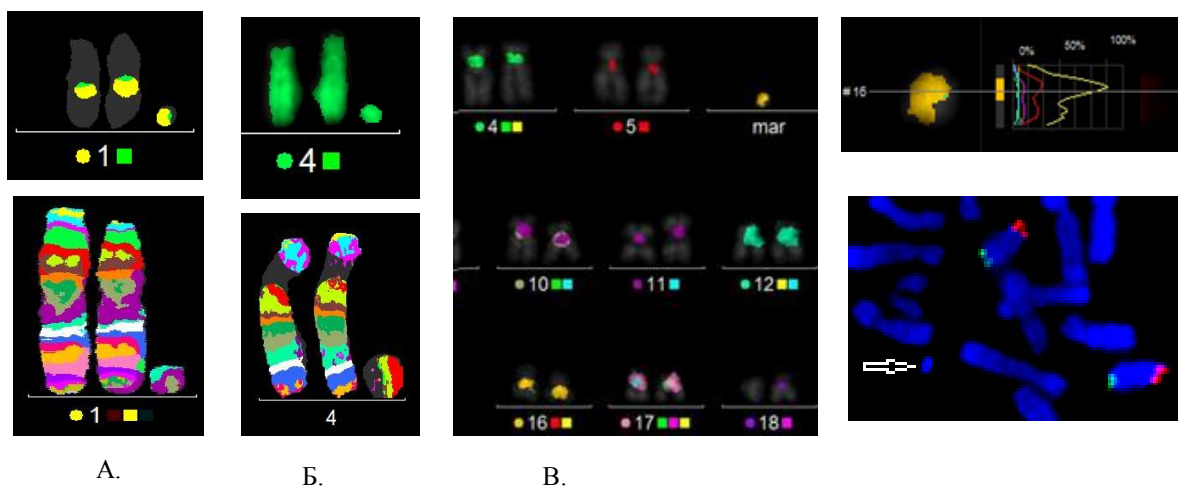


Рис. 16. Молекулярно-цитогенетическая диагностика min r мСМХ.

Примечание: А. min r(1) мСМХ (cenM-FISH, mBAND 1); Б. min r(4) мСМХ (M-FISH, mBAND 4); В. min r(16) мСМХ (cenM-FISH, профиль гибридизации мСМХ, Subtel 16p SpGreen, Subtel 16q SpOrange – мСМХ не содержит субтеломерные районы хромосомы 16).

мСМХ с неоцентромерой составили 5% случаев от всех идентифицированных хромосом. В двух случаях при молекулярно-цитогенетическом исследовании идентифицированы мСМХ в виде кольцевой хромосомы 1 с неоцентромерой класса 2, в результате которых формируется сбалансированный кариотип. Поводом для стандартного цитогенетического исследования здоровых, фенотипически нормальных мужчин послужило в одном случае рождение в семье ребенка с МВПР, в другом – обследование в рамках программы ВРТ. Результаты молекулярно-цитогенетической диагностики одного из этих пациентов представлены на рис. 17.

В результате комплексного подхода идентифицирована мСМХ и установлено, что кариотип является сбалансированным:

$r(1)(p13.3 \rightarrow \text{neo} \rightarrow p11.1)del(1)(\text{pter} \rightarrow 13.3::p11.1 \rightarrow \text{qter})$.

Интересно отметить, что у второго пациента с нормальным фенотипом выявлена аналогичная перестройка с практически одинаковыми точками разрыва, что также привело к формированию сбалансированного кариотипа.

Как подчеркивает Liehr T. (2011), каждый случай мСМХ – производной хромосомы 1 с неоцентромерой является уникальным событием и описано всего 6 случаев таких мСМХ, две из которых сформированы из короткого плеча хромосомы 1. С практической точки зрения, идентификация таких перестроек крайне важна в плане разработки протоколов преимплантационной генетической диагностики после

экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), поскольку такие пациенты имеют репродуктивные проблемы и, как правило, семьи нуждаются в проведении ВРТ.

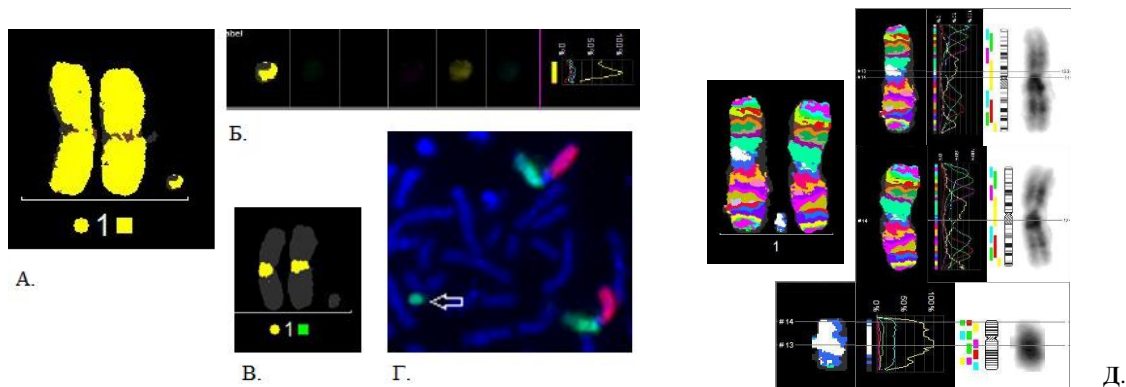


Рис. 17. Молекулярно-цитогенетическая диагностика r(1) мСМХ с неоцентромерой. Примечание: А. М-FISH: мСМХ является производной хромосомы 1; Б. Профиль гибридизации мСМХ; В. cenM-FISH: мСМХ не содержит центромерный район хромосомы 1; Г. Результат гибридизации с РСР 1p SpGreen и РСР 1q SpOrange ДНК-зондами: мСМХ сформирована из материала короткого плеча хромосомы 1 и является кольцевой; Д. mBAND 1: интерстициальная делеция одного из гомологов хромосомы 1 с формированием неоцентрической кольцевой хромосомы (класс 2).

В одном случае мСМХ с неоцентромерой - inv dup (8) - была идентифицирована у ребенка 4 лет с задержкой психомоторного развития и аномалиями развития (рис. 18).

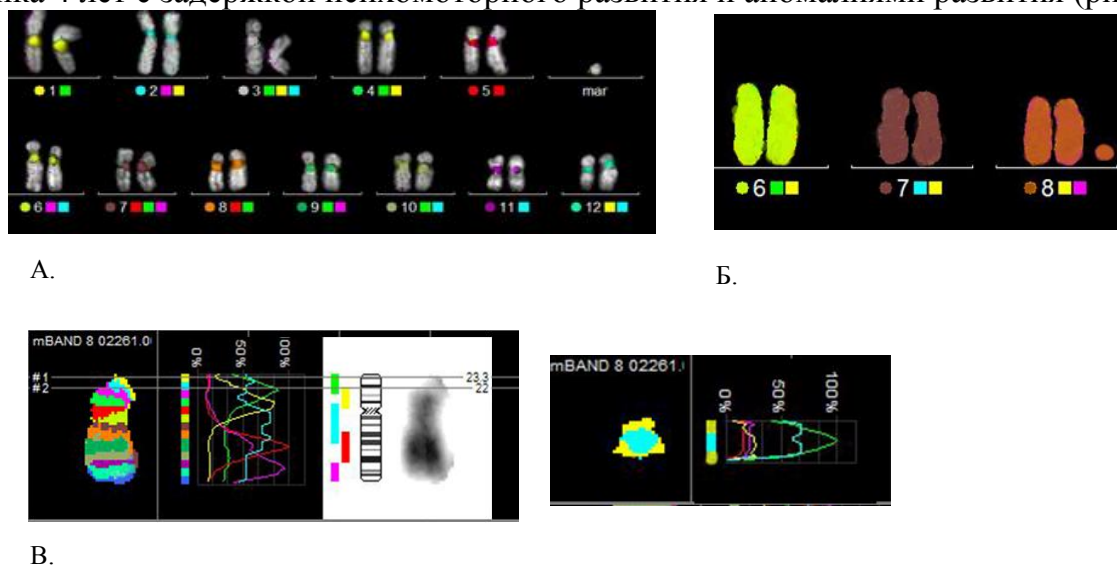


Рис. 18. Молекулярно-цитогенетическая диагностика inv dup (8) мСМХ с неоцентромерой.

Примечание: А. cenM-FISH: мСМХ не содержит центромеру; Б. М-FISH: мСМХ является производной хромосомы 8; В. mBAND 8: мСМХ является неоцентрической inv dup(8) (pter→p22::p22→pter) (класс 1). Представлены профили гибридизации мСМХ и нормального гомолога.

Хромосомные перестройки с неоцентромерой с образованием мСМХ в виде инвертированной дупликации (inv dup) (класс 1) приводят к частичной тетрасомии по дуплицированному району и в любом случае ассоциированы с аномальным фенотипом.

Среди всех мСМХ в особую группу выделяют комплексные мСМХ, т.е. маркерные хромосомы, которые содержат хромосомный материал, происходящий более чем из одной хромосомы и формирующиеся, как правило, в результате патологической мейотической сегрегации 3:1 в гаметогенезе у носителей реципрокных транслокаций. Такие мСМХ были идентифицированы в 8% случаев. В одном из четырех случаев

комплексных мСМХ идентифицирована сверхчисленная дериватная хромосома 22 вследствие патологической сегрегации материнской рекуррентной транслокации (11;22)(q23.3;q11.2), известная как синдром сверхчисленной $der(22)t(11;22)$ (синдром Эмануэл, OMIM #609029). В остальных случаях мСМХ являлись дериватными хромосомами вследствие мейотической сегрегации 3:1 нерекуррентных реципрокных транслокаций, в двух из которых было установлено материнское носительство АРТ.

Обращает на себя внимание тот факт, что во всех этих случаях мСМХ представлены в виде центрических (моносателлитных) хромосом и морфологически сходны с малыми акроцентрическими хромосомами 21 и 22, что может привести к ошибочной интерпретации результатов цитогенетического исследования. Показателен в этом отношении случай, когда, при проведении стандартного цитогенетического исследования ребенка 3 лет по поводу задержки психо-речевого развития, наличия лицевых и других аномалий развития обнаружена мСМХ. В результате комплексной молекулярно-цитогенетической диагностики мСМХ идентифицирована как дериватная хромосома 21 при несбалансированной транслокации между хромосомами 9 и 21. Повторное стандартное цитогенетическое исследование всех членов семьи показало, что мать и сын являются носителями реципрокной транслокации между хромосомами 9 и 21. Важность идентификации мСМХ в этом случае невозможно недооценить, поскольку последующий факт выявления семейного носительства АРТ принципиально меняет тактику медико-генетического (рис. 19).

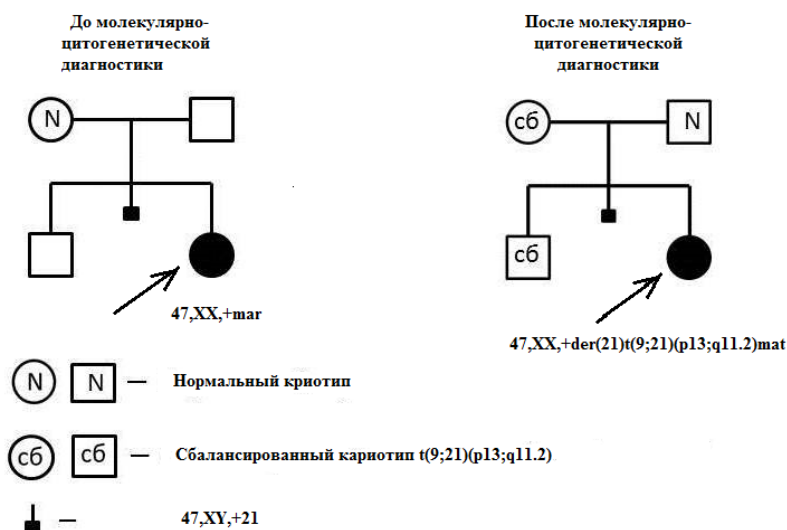


Рисунок 19. Родословная семьи до и после идентификации мСМХ.

Таким образом, мСМХ являются морфологически и генетически гетерогенной группой ХА, идентификация которых возможна только с использованием комплексного молекулярно-цитогенетического подхода. На основании полученных данных о молекулярно-цитогенетической характеристике 62 случаев аутосомных мСМХ с использованием стандартного цитогенетического и FISH-анализа разработан протокол их комплексной последовательной постнатальной диагностики (рис. 20).

Проведение центромеро-специфичной многоцветной FISH (cenM-FISH) позволяет оценить хромосомное происхождение практически всех мСМХ, за исключением хромосом 13, 14, 21, 22, Y и 20. При отсутствии возможности применения многоцветной FISH в случае обнаружения бисателлитных мСМХ — производных акроцентрических хромосом целесообразно использовать ДНК-зонды на хромосому 15, как самую частую производную мСМХ, маркирующие помимо короткого плеча, район q12-q13, что особенно рекомендуется при наличии у пациента фенотипических аномалий.

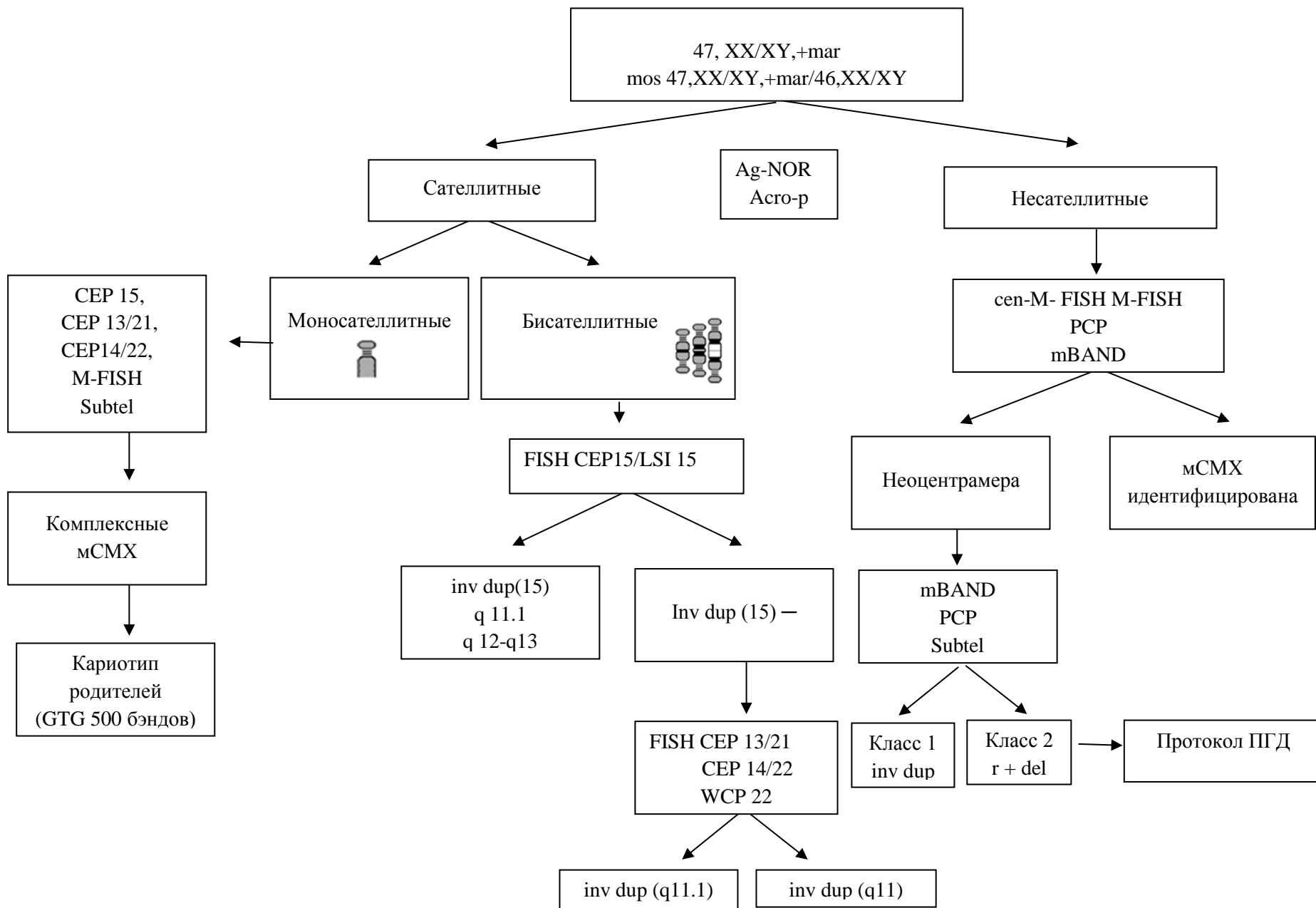


Рис. 20. Протокол идентификации mCMX.

Обнаружение моносателлитных мСМХ в виде центрических хромосом в регулярной форме позволяет заподозрить комплексное происхождение мСМХ и проводить целенаправленную идентификацию дериватных хромосом вследствие 3:1 патологической мейотической сегрегации родительских реципрокных транслокаций.

Идентификация класса 2 мСМХ с неоцентромерой является важным этапом обследования пациентов в рамках программы ВРТ, поскольку позволяет включать соответствующие ДНК-зонды в протокол преимплантационной генетической диагностики.

Структура геномного дисбаланса у пациентов с аномалиями фенотипа и нормальным кариотипом при стандартном цитогенетическом исследовании

Более 35 лет исследование дифференциально окрашенных хромосом (GTG-окраска) являлось «золотым стандартом» в клинической цитогенетике. При разрешающей способности этого метода выявлять несбалансированные хромосомные аномалии размером 5-10 млн.п.н и более, в крайне редких случаях можно диагностировать геномный дисбаланс размером 3 млн.п.н., но и, наоборот, не выявить ХА на уровне разрешающей способности, в зависимости от геномного района, вовлекаемого в перестройку. Идентификация каждого случая структурной хромосомной перестройки является неотъемлемой частью медико-генетического консультирования семьи. Широкое внедрение в классическую цитогенетику метода ХМА позволило повысить эффективность выявления клинически значимого геномного дисбаланса до 20%- 25% у пациентов с идиопатической умственной отсталостью и множественными врожденными аномалиями развития (Miller D. et al., 2010; Kang G., Koo S., 2012; Ahn J. et al., 2013; Lay-Son G. et al., 2015).

Структура клинически значимых субмикроскопических вариаций числа копий участков ДНК (CNVs), выявленных при хромосомном микроматричном анализе

Хромосомный микроматричный анализ (ХМА) проведен в 21 случае пациентам с умственной отсталостью и МВПР или аномалиями развития, у которых при стандартном цитогенетическом исследовании кариотип определен как нормальный. Во всех этих случаях был выявлен и локализован в геноме клинически значимые, ассоциированные с аномальным фенотипом, CNVs размером от 0,4 млн.п.н. до 21,6 млн.п.н. (табл. 12).

В 16 случаях выявлен двухсегментный геномный дисбаланс (№№ 1-14, 20-21). В 5 случаях установлено, что причиной аномального фенотипа у пациентов является односегментный дисбаланс, представленный субмикроскопическими CNVs в виде терминальных делеций (№№16, 19), интерстициальной делеции (№№ 18, 15) и интерстициальной дупликацией (№17), которые были верифицированы FISH-методом с соответствующими ДНК-зондами.

Двухсегментный геномный дисбаланс, представленный одновременным присутствием CNVs в виде терминальных делеции и дупликации негомологичных хромосом, отмечался у 12 пациентов (случаи 1-14). Исходя из геномной локализации и характеристики CNVs (делеция или дупликация) во всех случаях выполнено молекулярно-цитогенетическое исследование (FISH) не столько с целью верификации геномного дисбаланса, сколько для возможности определить его структуру. При таргетном молекулярно-цитогенетическом исследовании родителей в тех случаях, когда это было возможно, установлено носительство одним из них реципрокной транслокации. В случаях, когда родители были недоступны для исследования, дериватные хромосомы визуализировали по распределению гибридационных сигналов при FISH-анализе.

Таблица 12. Спектр клинически значимых CNV у пациентов умственной отсталостью и/или множественными аномалиями развития.

	Результат ХМА	Размер CNV (млн. п.н.)	Верификация FISH	ДНК-зонды	Структура геномного дисбаланса
1	del 4(p16.3) dup 17(q25.1q25.3)	0,4 8,1	отец – ish t(4;17)	Subtel 4p Subtel 17q	der(4)t(4;17)(p16.3;q25.1)pat
2	del 3(p26.1 p26.3) dup 17(q24.3q25.3)	7,7 11,6	мать –ish t(3;17)	Subtel 3p Subtel 17q	der(3)t(3;17)(p26.1;q24.3)mat
3	del 18(p11.31p11.32) dup 1(q43.1q44)	4,2 9,4	мать –ish t(1;18)	Subtel 1q Subtel 18p	der(18)t(1;18) (q43.1;p11.31)mat
4	del 6(q27) dup 9(q34.2q34.3)	1,7 4,3	отец - ish t(6;9)	Subtel 6q Subtel 9q	der(6)t(6;9)(q27;q34.2)pat
5	del 2(q37.3) dup 1(q42.3q44)	3,3 13,7	мать – ish t(1;2)	Subtel 1q Subtel 2q	der(2)t(1;2)(q42.3;q37.3)mat
6	del 13 (q34) dup 7(q36.1 q36.3)	1,7 7,3	ish der(13)(7;13)	Subtel 7q Subtel 13q	der(13)t(7;13)(q36.1;q34)
7	del 22(q13.33) dup 1(p36.3)	1,8 2,2	ish der(22)t(1;22)	Subtel 1p Subtel 22q	der(22)t(1;22)(p36.3;q13.3)
8	del 4(p16.1 p16.3) dup 8(p23.1p 23.3)	8,6 12,5	ish der(4)t(4; 8)	Subtel 4p Subtel 8p	der(4)t(4;8)(p16.1;p23.1)
9	del 11(q24.1q25) dup 6(q25.2q27)	12,2 16,7	ish der(11)t(6;11) отец - ish t(6;11)	Subtel 6q Subtel 11q	der(11)t(6;11)(q25.2;q24.1)pat
10	del 13(q11q12.11) dup14(q11.2q12)	5,4 8,6	ish der(14)t(13;14) отец–ish t(13;14)	WCP 13 WCP 14	-13,+der(14)t(13;14) (q12.11;q12)pat
11	del 21(q11.2q21.3) dup 14(q11.2q21.1)	5,6 18,3	ish der(14)t(14;21) отец–ish t(14;21)	WCP 14 WCP 21	+der(14)t(14;21) (q21.1;q21.3)pat,-21
12	del 16(p13.3) dup 7(p22.3)	4,5 1,3	ish der(16)t(7;16) отец-ish t(7;16)	Subtel 7p Subtel 16p	der(16)t(7;16)(p22.3;p13.3)pat
13	del 20(p13) dup 1(q43q44)	1,6 10,9	ish der(20)t(1;20)	Subtel 1q Subtel 20p	der(20)t(1;20)(q43;p13)
14	del 11(q25) dup 6(p24.3)	1,6 10	ish der(11)t(6;11)	Subtel 6p Subtel 11q	der(11)t(6;11)(q24.3;q25)
15	del 15(q11.2q13.3)	18,3	отец-ish t(13;15)	LSI D15S10/ CEP /PML LSI GABRB3/ CEP 15	+der(13)t(13;15) (q11.1; q13.3)pat,-15
16	dup 17(p11.2)	3,5	ish dup (17)	LSI RAI	dup(17)(p11.2)dn
17	del 1(q44)	4,2	ish del(1)	Subtel 1q	del(1)(q44)dn
18	del 22(q13.31q13.33)	4,9	ish del(22)	LSI TBX/ SHANK3	del(22)(q13.31)dn
19	del 8(p23.3)	2,4	ish del(8)(p23.3)	Subtel 8p	del(8)(p23.3)dn
20	dup 5(p14.3p15.2) del 5(p15.2p15.33)	9,6 13,6	ish del(5)dup(5)	mBAND 5	der (5) del(5)(p15.2p15.33) dup(5)(p15.2p14.3)dn
21	dup10(q26.13q26.3) del 10(q26.3)	8 3	ish del(10)dup(10)	Tel 10q mBAND 10	der (10) del(10)(q26.3) dup(10)(q26.3q26.1)dn

Молекулярно-цитогенетическое исследование показало, что наличие клинически значимых CNVs у пациентов во всех указанных случаях является следствием патологической сегрегации реципрокных транслокаций по совместному-1 типу.

В случаях 10 и 11 характер геномного дисбаланса в виде одновременной делеции и дупликации интерстициальных районов акроцентрических хромосом позволил предположить наличие у пациентов несбалансированной транслокации вследствие совместного-2 типа патологической сегрегации, что определило дизайн молекулярно-цитогенетического исследования.

Особенность геномного покрытия, определяющаяся отсутствием на микроматрице фрагментов гетерохроматиновых районов хромосом, не позволяет выявлять перестройки, затрагивающие эти районы. Так, в случае 15 (табл. 12) у ребенка с фенотипическими проявлениями синдрома Прадера-Вилли при ХМА был выявлен

односегментный геномный дисбаланс в виде делеции размером 18,3 млн.п.н. в «критическом» по делеции районе 15q11-q13. Поскольку в семье зарегистрированы повторные случаи заболевания, было проведено молекулярно-цитогенетическое исследование родителей с целью выявления носительства микроделеции, в результате которого выяснилось, что отец является носителем реципрокной транслокации (13;15), что и позволило объяснить наличие повторных случаев заболевания.

Таким образом, геномный дисбаланс, обусловленный одновременным присутствием CNVs в виде дупликации и делеции, затрагивающих как терминальные, так и интерстициальные районы двух негомологичных хромосом, является, как правило, следствием патологической мейотической сегрегации родительской реципрокной транслокации и требует обязательного молекулярно-цитогенетического исследования родителей для выявления носителя транслокации.

Как видно из данных, представленных в табл. 12, в случаях 20 и 21 CNVs в виде делеции и дупликации одновременно присутствуют на одной из гомологичных хромосом. Молекулярно-цитогенетическое исследование позволило не только верифицировать данный геномный дисбаланс, но и выявить механизм его возникновения. При использовании многоцветных технологий FISH установлено, что в обоих случаях геномный дисбаланс обусловлен наличием у пациентов редкого типа ХА - инвертированной дупликации со смежной делецией - *inv dup del (5p)* и *inv dup del (10q)*. Диагностика такого класса ХА стала возможной только с развитием высокотехнологичных методов исследования. Полученные данные о двух случаях нерекуррентных *inv dup del* подтверждают факт инвертированности терминальных дупликаций со смежной делецией, в том числе и при делеции большего, чем дупликация размера.

ХМА является эффективным методом выявления клинически значимых CNVs, позволяя определить тип геномного дисбаланса и его локализацию в геноме. Однако совершенно очевидно, что такой информации недостаточно для медико-генетического консультирования семьи, в которой есть больной ребенок, по поводу оценки повторного риска хромосомной патологии. Полученные результаты наглядно демонстрируют необходимость проведения молекулярно-цитогенетического исследования (FISH) после выявления клинически значимых CNVs для установления механизма формирования геномного дисбаланса. Поскольку существенным недостатком метода ХМА является невозможность детекции сбалансированных хромосомных перестроек, в частности реципрокных транслокаций (Kang G., Koo S., 2012), молекулярно-цитогенетическое исследование родителей при обнаружении у ребенка субмикроскопических CNVs позволяет выявлять факт сбалансированного носительства АРТ у одного из родителей.

Полученная в результате проведения ХМА информация о виде и геномной локализации CNVs размером более 5 млн.п.н. также обуславливает возможность ревизии кариотипа как пациента, так и его родителей при анализе дифференциально окрашенных хромосом на уровне 550 бэндов для установления происхождения хромосомной перестройки.

На основании молекулярно-цитогенетического исследования клинически значимых CNVs, выявленных в 21 случае у пациентов с аномальным фенотипом и нормальным кариотипом при стандартном цитогенетическом исследовании разработана схема обследования пациентов при проведении ХМА (рис. 21).

Для верификации результатов ХМА могут быть использованы любые таргетные методы исследования, такие как КФ-ПЦР и MLPA.

Таким образом, только комплексное использование различных методов исследования является оптимальным для диагностики геномного дисбаланса у

пациентов с идиопатической умственной отсталостью и множественными врожденными аномалиями, позволяет поставить окончательный диагноз и определить тактику и стратегию медико-генетического консультирования семьи.

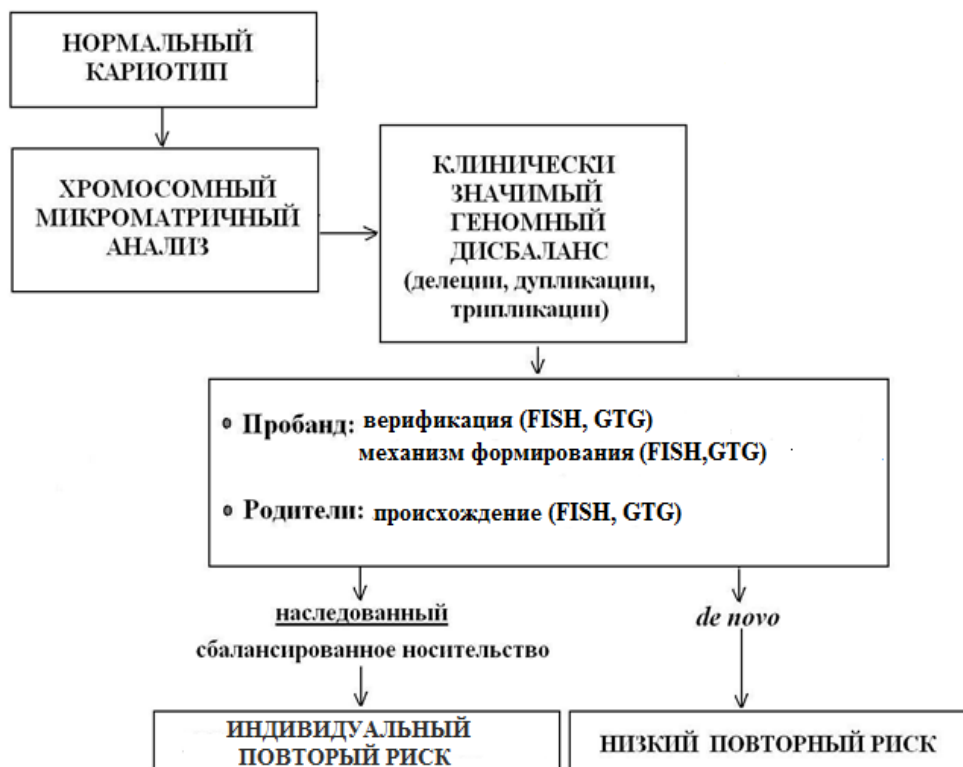


Рис. 21. Схема обследования после проведения ХМА.

Синдром Паллистера–Киллиана

За период с 2011 по 2015 гг. уточняющая диагностика синдрома Паллистера-Киллиана (СПК) проводилась у 15 пациентов в возрасте от 4 месяцев до 2 лет. Хотя ни один из пороков развития, характерных для СПК, не является патогномичным, клинические проявления этого синдрома в постнатальном периоде довольно специфичны, чтобы его заподозрить. Тем не менее, эти пациенты были направлены из различных регионов в ФГБНУ «МГНЦ» для медико-генетического консультирования с различными направительными диагнозами и во всех случаях имели нормальный кариотип при исследовании препаратов из культуры лимфоцитов периферической крови.

При проведении молекулярно-цитогенетического исследования (FISH) СПК диагностирован в 11 из 15 случаев (75%) (табл. 13). В 4 случаях при молекулярно-цитогенетическом исследовании с соответствующими ДНК-зондами $i(12)(p10)$ мСМХ не была выявлена ни в препаратах из клеток крови, ни в препаратах из буккального эпителия, что позволило исключить СПК у пациента.

Верификация клинического диагноза СПК является основной проблемой постнатальной цитогенетической диагностики этого синдрома. Стандартное цитогенетическое исследование хромосомных препаратов из ФГА-стимулированной культуры лимфоцитов периферической крови у пациентов с СПК не является оптимальным, поскольку клеточный клон со сверхчисленной $i(12)(p10)$ выявляется в культуре лимфоцитов периферической крови с частотой 0 - 2%. Поэтому выбор ткани и метода ее исследования для корректной постановки цитогенетического диагноза при СПК является принципиально важным. С наибольшей частотой (до 100%) клеточный клон со сверхчисленной $i(12)(p10)$ выявляется в культуре фибробластов кожи (Speleman F. et al, 1991). Однако биопсия кожи является травматичной и болезненной процедурой.

Учитывая, что пациенты с СПК – это, как правило, маленькие дети, предпочтительно использовать соскоб со слизистой оболочки щеки как наименее инвазивный, безболезненный и легкодоступный способ получения материала для молекулярно-цитогенетического исследования.

Таблица 13. Эффективность выявления i(12)(p) мСМХ в различных тканях.

№	Препараты из клеток буккального эпителия	«Прямые» препараты из клеток крови
1	D12Z1x3 (35%)/D12Z1x2 (65%)	D12Z1x3 (10%)/D12Z1x2(90%)
2	D12Z1x3 (57%)/D12Z1x2 (43%)	D12Z1x3 (9%)/D12Z1x2 (91%)
3	D12Z1x3 (57%)/D12Z1x2 (43%)	D12Z1x3 (13%)/D12Z1x2 (87%)
4	D12Z1x3 (79%)/D12Z1x2 (21%)	D12Z1x3 (25%)/D12Z1x2 (75%)
5	D12Z1x3 (79%)/D12Z1x2 (21%)	—
6	D12Z1x3 (47%)/D12Z1x2 (53%)	D12Z1x3 (10%)/D12Z1x2 (90%)
7	—	D12Z1x3 (14%)/D12Z1x2 (86%)
8	D12Z1x3 (71%)/DXZ1x2 (29%)	—
9	D12Z1x3 (66%)/D12Z1x2 (34%)	D12Z1x3 (8%)/D12Z1x2 (92%)
10	D12Z1x3 (69%)/D12Z1x2 (31%)	D12Z1x3 (9%)/D12Z1x2 (91%)
11	D12Z1x3 (86%)/D12Z1x2 (14%)	D12Z1x3 (22%)/D12Z1x2 (78%)
12-15	D12Z1x2, tel 12p++ (100%)	D12Z1x2(100%)

Примечание: D12Z1 – центромероспецифичный локус хромосомы 12; x 3 – три копии локуса в интерфазном ядре; x2 – две копии локуса в интерфазном ядре при гибридизации с CEP 12 ДНК-зондом; Subtel 12p++ - наличие двух копий субтеломерного района короткого плеча хромосомы 12.

Таким образом, диагноз СПК необходимо подтверждать молекулярно-цитогенетическим методом (FISH) при исследовании препаратов из некультивированных клеток с использованием ДНК-зондов, специфичных для хромосомы 12. Учитывая наличие ткане-специфичного мозаицизма, в каждом случае желательно подтверждать молекулярно-цитогенетический диагноз на клетках другой ткани, в частности, при проведении интерфазной FISH на прямых препаратах или мазках из клеток периферической крови. Использование комбинации хромосомо-специфичных ДНК-зондов на субтеломерный район короткого плеча хромосомы 12 и прицентромерный район хромосомы 12 является целесообразным для уверенной диагностики СПК (Шилова Н.В. и др., 2012). Детекцию субтеломерного района короткого плеча хромосомы 12 необходимо проводить во всех случаях отсутствия мозаичного клона i(12)(p10) мСМХ у пациентов с подозрением на СПК, поскольку описаны случаи формирования нецентромеры на маркерной хромосоме (Huang X. et al., 2007).

Молекулярно-цитогенетическая диагностика дополнительного хромосомного материала неизвестного происхождения

Дополнительный хромосомный материал неизвестного происхождения на какой-либо из гомологичных хромосом может быть вследствие различных хромосомных перестроек и в международной номенклатуре цитогенетики человека (ISCN) обозначается как 46,add(#) (Shaffer L. G et al., 2013). Наиболее типичным примером является дериватная хромосома при несбалансированной транслокации. Как правило, происхождение дополнительного хромосомного материала выясняется при исследовании кариотипа родителей и определении носителя реципрокной транслокации.

Трудности интерпретации возникают в случае невозможности, по каким-либо причинам, проведения цитогенетического исследования родителей или одного из супругов, а также в случаях отсутствия четкого паттерна дифференциального GTG-окрашивания в дополнительном хромосомном материале, не позволяющего определить его происхождение.

Уточняющая молекулярно-цитогенетическая диагностика проведена в 24 случаях, когда при стандартном цитогенетическом обследовании пациентов с нарушением физического и психомоторного развития, а также аномалиями и/или пороками развития было невозможно интерпретировать дополнительный материал, присутствующий на одном из хромосомных гомологов (табл. 14).

Таблица 14. Результаты молекулярно-цитогенетической диагностики аномального кариотипа.

№	Кариотип (GTG)	ДНК-зонды	XA
1	46,XX,add(9)(p22)?	M-FISH, Subtel 8p/18q	46,XX,der(9),t(9;18)(p22;q21)
2	46,XX,add(11)(q23)?	M-FISH, Subtel 8p/18q	46,XX,der(11)t(11;18)(q23;q21)
3	46,XY,add(10)(p ?)	M-FISH, Subtel 8p/8q	46,XY,der(10)t(8;10)(p;q)
4	46,XX,add(16)(p?)	M-FISH, Subtel 5p/5q	46,XX,der(16)t(5;16)(p;p)
5	46,XY,add(14)(p11,2)	M-FISH, Subtel 9p/9q	46,XY,der(14)t(9;14)(p12;p11.2)
6	46,XY,add(21)(p11,2)	M-FISH, Subtel 9p/9q	46,XY,der(21)t(9;21)(p;p11.2)
7	46,XY,add(3)(p?)	M-FISH, Subtel 2p/2q	46,XY,der(3)t(2;3)(p;p)
8	46,XY,add(21)(p12)	M-FISH, Subtel 11p/11q	46,XY,der(21)t(11;21)(q14;p11.2)dn
9	46,XX,add(9)(p24)?	M-FISH, Subtel 16p/16q	46,XX,der(9),t(9;16)(p24;p12)
10	46,XY,add(8)(p?)	M-FISH, Subtel 12 p/12q	46,XY,der(8)t(8;12)(p12;q23)
11	46,XY,add(8)(p12)	M-FISH, Subtel 7p/7q	46,XY,der(8)t(7;8)(q22;q21.1)dn
12	46,XY,add(10)(q)	M-FISH, Subtel 4p/4q	46,XY,der(10)t(4;10)(p14;q26)
13	46,XX,add(6)(p25)	M-FISH, Subtel 3p/3q	46,XX,der(6)t(3;6)(q24;p25)
14	46,XY,add(8)(q22)	M-FISH, Subtel 7p/7q	46,XY,der(8)t(7;8)(q22;p21)dn
15	46,XY,add(10)(p)	M-FISH, Subtel 5p/5q	46,XY,der(10)t(5;10)(p14;p11.2)
16	46,XX,add(6)(p25)	M-FISH, Subtel 3p/3q	46,XX,der(6)t(3;6)(q24;p25)
17	46,XX,add(17)(q25)	M-FISH, Subtel 13q	46,XX,der(17)t(13;17)(q22;q25)dn
18	46,XX,add(15)(p11.2)	M-FISH, Subtel 8p/8q	46,XX,der(15)t(8;15) (q22.1;p11.2)dn
19	46,XX,add(8)(p23.3)	M-FISH, Subtel 9p/9q	46,XX,der(8)t(8;9)(p23.3;q34.3)dn
20	46,XX,add(4)(p16)	M-FISH, mBAND 4	46,XX,dup(4)(p16p14)dn
21	46,XY,add(8)(p23)	M-FISH, Subtel 8p/8q	46,XY,dup(8)(p12p23)dn
22	46,XX,add(5)(p15)	WCP 5, Subtel 5p	46,XX,dup(5)(p15p15.3)dn
23	46,XX,add(X)(p?)	M-FISH, mBAND 16, CGH	46,X,der(X)ins(X;16) (p21.1;q11.2q22)dn
24	46,XX,add(8)(q ?)	M-FISH, mBAND 4	46,XX,der(8)ins(8;4) (q22;dupq35q31.3)

Полученные данные позволили разработать протокол комплексного молекулярно-цитогенетического исследования, позволяющего идентифицировать аномалии кариотипа, обусловленные дополнительным материалом неизвестного происхождения (рис. 22). Первоочередным и обязательным условием является кариотипирование родителей пробанда, что в большинстве случаев позволяет выяснить происхождение дериватной хромосомы. Если обследование хотя бы одного родителя не представляется возможным молекулярно-цитогенетическое исследование следует начинать с многоцветной FISH с последующим алгоритмом в зависимости от типа XA.



Рис. 22. Схема проведения молекулярно-цитогенетического исследования при наличии в кариотипе дополнительно хромосомного материала неизвестного происхождения.

ВЫВОДЫ

1. При ретроспективном анализе результатов пренатальной цитогенетической диагностики отмечается достоверная тенденция повышения эффективности выявления хромосомных аномалий за период 2001-2012 гг. Выявлено статистически значимое повышение доли случаев пренатальной цитогенетической диагностики в I триместре беременности, снижение количества инвазивных диагностических процедур в целом при достоверном увеличении числа процедур, выполненных в I триместре беременности по поводу расширенной воротниковой зоны у плода. Установлено достоверное повышение частоты диагностированных случаев трисомии по хромосоме 21 при стабильной эффективности диагностики других хромосомных аномалий.

2. Показана высокая диагностическая значимость расширенной воротниковой зоны в качестве маркера не только наиболее частых анеуплоидий, но и клинически значимых структурных хромосомных перестроек у плода. Анализ группы плодов с расширенной воротниковой зоной > 95-го перцентиля нормативных для срока значений показал, что при трисомии (по хромосомам 13, 18, 21), моносомии X и структурных аномалиях хромосом величина воротниковой зоны достоверно выше, чем у плодов с нормальным кариотипом ($p < 0,01$). Не обнаружено достоверных различий в размере воротниковой зоны у плодов с триплоидией и другими гоносомными анеуплоидиями, а также их мозаичными формами.

3. При использовании методов быстрой детекции анеуплоидии суммарный резидуальный риск для клинически значимых и потенциально клинически значимых хромосомных аномалий в группе беременных женщин с высоким риском по анеуплоидии у плода (материнский возраст 35 лет и более, положительный результат биохимического скрининга) равен 0,29% при эффективности их выявления 99,7%. В группе беременных женщин с высоким риском по анеуплоидии у плода (расширенная >

95-го перцентиля нормативных для срока значений воротниковая зона) равен 0,8% при эффективности их выявления 99,2%. Полученные результаты позволяют использовать методы быстрой детекции анеуплоидии в качестве альтернативы стандартному пренатальному кариотипированию при соблюдении определенного алгоритма мониторинга беременности.

4. Пренатальная селекция аутомных реципрокных транслокаций происходит с преимущественным формированием сбалансированных гамет (зигот) вследствие альтернативной мейотической сегрегации.

5. При оценке повторного риска рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом у носителей аутомной реципрокной транслокации помимо эмпирического риска необходимо учитывать пахитенную конфигурацию квадриллента, относительный размер хромосомного дисбаланса, потенциальную жизнеспособность зигот и терминальность точек разрыва на дериватных хромосомах.

6. Критерий терминальности точек разрыва при аутомных реципрокных транслокациях независимо связан с риском рождения жизнеспособного ребенка с хромосомным дисбалансом. Шанс рождения такого ребенка в 6 раз выше у носителей транслокаций, в которых хотя бы один из дериватов имеет терминальную точку разрыва.

7. Малые сверхчисленные маркерные хромосомы являются морфологически и генетически гетерогенной группой редких хромосомных аномалий, требующих молекулярно-цитогенетической идентификации с целью оптимизации медико-генетического консультирования и преимплантационной генетической диагностики. Разработан алгоритм молекулярно-цитогенетической идентификации малых сверхчисленных маркерных хромосом.

8. Геномный дисбаланс вследствие субмикроскопических и микроскопических клинически значимых вариаций количества копий участков ДНК (CNVs) в виде делеции и дупликации обуславливается различными механизмами его формирования, что определяет необходимость комплексного подхода в диагностике структурной вариабельности генома. Разработаны алгоритмы лабораторного обследования по результатам хромосомного микроматричного анализа и при наличии дополнительного хромосомного материала неизвестного происхождения.

ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

1. Алгоритм обследования беременных женщин с высоким риском по анеуплоидии у плода по данным неинвазивного скрининга в I триместре беременности, у которых в результате использования методов ускоренной детекции анеуплоидии выявлен нормальный кариотип плода, должен включать проведение экспертного УЗИ во II триместре, с последующей инвазивной пренатальной цитогенетической диагностикой и исследованием дифференциально окрашенных хромосом при обнаружении эхографических маркеров хромосомных аномалий.

2. В группе беременных женщин с низким риском по анеуплоидии у плода рекомендуется использование методов ускоренной детекции анеуплоидии в качестве альтернативных стандартному кариотипированию. Ускоренная детекция анеуплоидии у плода с использованием интерфазного FISH-анализа на препаратах из клеток цитотрофобласта рекомендована при отсутствии, неудовлетворительной морфологии хромосом или малом количестве метафазных пластинок.

3. Рекомендуется участие врача-лабораторного генетика (цитогенетика) в медико-генетическом консультировании семей по поводу носительства аутомных реципрокных транслокаций.

4. Проведение пренатальной цитогенетической диагностики при родительском носительстве аутосомных реципрокных транслокаций, сегрегирующих с образованием гамет, из которых невозможно формирование жизнеспособных зигот, нецелесообразно.

5. Приоритетным объектом для проведения молекулярно-цитогенетической диагностики синдрома Паллистера-Киллиана являются препараты из клеток буккального эпителия. Полученные результаты диагностики желательнее подтверждать на клетках другой ткани, например, при интерфазной FISH на прямых препаратах или мазках из клеток периферической крови с использованием комбинации хромосома-специфичных ДНК-зондов на субтеломерный район короткого плеча и центромерный район хромосомы 12. Детекцию субтеломерного района короткого плеча хромосомы 12 необходимо проводить во всех случаях отсутствия мозаичного клона с i(12)(p10) малой сверхчисленной маркерной хромосомой.

6. Важным этапом обследования пациентов в рамках программы вспомогательных репродуктивных технологий является идентификация малых сверхчисленных маркерных хромосом с нецентромерой класса 2, которая позволяет включать соответствующие ДНК-зонды в протокол преимплантационной генетической диагностики.

7. Геномный дисбаланс, обусловленный одновременным присутствием клинически значимых вариаций количества копий участков ДНК (CNVs) в виде дупликации и делеции, затрагивающих как терминальные, так и интерстициальные районы двух негомологичных хромосом, является, как правило, следствием патологической мейотической сегрегации родительской реципрокной транслокации и требует обязательного молекулярно-цитогенетического исследования родителей для выявления носителя транслокации.

8. Идентификация аномалий кариотипа, обусловленных наличием дополнительного хромосомного материала неизвестного происхождения, позволяет дифференцировать несбалансированные транслокации и инсерции, что является важным для корректной оценки повторного риска рождения ребенка с хромосомным дисбалансом при носительстве сбалансированных хромосомных перестроек.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендуемых ВАК МОН РФ:

1. Золотухина Т.В., Кузнецов М.И., Костюк Э.В., **Шилова Н.В.**, Солониченко В.Г. Выявление хромосомной патологии у плодов при использовании кордоцентеза // Генетика. - 1991. – Т. 27. - № 8. - С. 1481-1487.
2. Золотухина Т.В., Кузнецов М.И., Костюк Э.В., Колесникова Т.Н., Мазурова О.Л., Матвеева Е.Н., **Шилова Н.В.** Пренатальная диагностика как путь профилактики врожденных и наследственных заболеваний // Вестник РАМН. - 1992. - № 4. - С. 14-20.
3. Zolotukhina T., **Shilova N.** Chromosomal Mosaicism of Extraembryonic Cells Detected by Prenatal Diagnosis // Russ.J.of Genet. – 1995. - V 31. - N 9. – P. 1124-1127.
4. Золотухина Т.В., Мирошникова И.В., **Шилова Н.В.**, Мельникова Л.Л., Маркова Ж.Г. Результаты неинвазивного пренатального обследования беременных в I триместре // Медицинская генетика. – 2004. – Т. 3. - № 12. – С. 577-583.
5. **Шилова Н. В.**, Золотухина Т.В. - Интерфазная флуоресцентная in situ гибридизация (FISH) в диагностике численных хромосомных aberrаций // Медицинская генетика. – 2007. – Т. 6. - № 10 (64). - С. 53-57.
6. Мирошникова И.В., Маркова Ж.Г., **Шилова Н.В.**, Золотухина Т.В. Оценка эффективности различных комбинаций маркеров I триместра беременности при неинвазивном скрининге и расчете риска синдрома Дауна у плода // Медицинская генетика. – 2007. – Т.6. - № 9 (63). – С. 37-41.

7. Антоненко В.Г., Барановская Л.И., Левина Л.Я., **Шилова Н.В.**, Золотухина Т.В., Ярашев А.Н., Симонова Л.В., Иванов В.И. Моносомия 1p36: описание случая и информационный анализ синдрома // Медицинская генетика. – 2007. Т.6. - №7. - С. 25-31.
8. Chernykh V.B., Vyatkina S.V., Antonenko V.G., **Shilova N.V.**, Zolotukhina T.V., Kurilo L.F., Chukhrova A.L., Polyakov A.V. - Unique mosaic X;Y translocation/inversion in infant 45,X male // Am. J. Med. Genet. A. – 2008. - V 146A. - Iss.24. - P. 3195-3197.
9. **Шилова Н.В.**, Черных В.Б., Цветкова Т.Г., Галкина В.А., Осипова Е.В., Мошкова М.Ю., Поляков А.В., Золотухина Т.В. Комплексный подход в диагностике уникальной аутосомно-гоносомной перестройки // Медицинская генетика. – 2009. - №2. - С. 44-47.
10. Chernykh V., Kurilo L., **Shilova N.**, Zolotukhina T., Ryzhkova O., Bliznetz E., Polyakov A. Hidden X Chromosomal Mosaicism in a 46,XX Male // Sex. Dev. – 2009. V.3. – P. 183-187.
11. Райгородская Н.Ю., Морозов Д.А., Черных И.Б., Болотова Н.В., Жарков Д.А., **Шилова Н.В.**, Золотухина Т.В., Цмокалюк Е.Н. Овотестикулярное нарушение формирования пола вследствие гоносомного мозаицизма // Проблемы эндокринологии. – 2010. - Т.56. - №2. С. 42-46.
12. Козлова Ю.О., Юдина Е.В., Миньженкова М.Е., **Шилова Н.В.**, Золотухина Т.В. Комплексное обследование плодов с расширенным воротниковым пространством: первый опыт пренатальной диагностики микроделеционных синдромов 22q11.2 в клинической практике // Пренатальная диагностика. – 2011. - Т10. - №1. С. 47-55.
13. Золотухина Т.В., **Шилова Н.В.**, Миньженкова М.Е., Козлова Ю.О., Цветкова Т.Г., Маркова Ж.Г., Антоненко В.Г. Использование FISH-метода для диагностики конституциональных хромосомных aberrаций // Медицинская генетика. – 2011. - №11. - С. 3-8.
14. Raygorodskaya N., Chernykh V., Morozov D., Olutoye O., Bolotova N., Averyanov A., maslyakova G., **Shilova N.**, Zolotukhina T. A 3-year-old boy with ovotestes: gender reassignment and surgical management // J. Pediatr. Endocr. Met. – 2011. – V. 24(7-8). – P. 587-589.
15. **Шилова Н.В.**, Козлова Ю.О., Демина Н.А., Петухова М.С., Миньженкова М.Е., Мирошникова И.В., Юдина Е.В., Золотухина Т.В. Синдром Паллистера-Киллиана: особенности пре- и постнатальной диагностики // Медицинская генетика. – 2012. - № 3. С. 20-26.
16. Миньженкова М.Е., **Шилова Н.В.**, Козлова Ю.О., Маркова Ж.Г., Цветкова Т.Г., Демина Н.А., Золотухина Т.В. Молекулярно-цитогенетическая диагностика необычного хромосомного мозаицизма // Медицинская генетика. – 2012.- №3. – С. 38-41.
17. Золотухина Т.В., **Шилова Н.В.**, Юдина Е.В., Миньженкова М.Е., Козлова Ю.О. Пренатальная диагностика редких хромосомных аномалий // Медицинская генетика. – 2012. - Т.11 - № 9 (123). – С. 19-24.
18. Козлова Ю.О., **Н.В. Шилова**, Е.В. Юдина, М.Е. Миньженкова, Т.В. Золотухина. Пренатальная диагностика микроделеции 22q11.2 // Пренатальная диагностика . - 2012. - Т.11. - №4. - С. 311-315.
19. Золотухина Т.В., Е.В. Юдина, **Н.В. Шилова**, М.Е. Миньженкова, Козлова Ю.О., Маркова Ж.Г. Спектр редких хромосомных аномалий, выявленных пренатально у плодов с увеличенным воротниковым пространством // Журнал акушерства и женских болезней. – 2013. - Т. 62. - выпуск 2. – С. 88-92.
20. М.Е. Min'zhenkova, N.V. Shilova, Zh.G. Markova, V.G. Antonenko, I.N. Lebedev, Yu.O.Kozlova, V.V. Zemlyakova, T.V. Zolotukhina // Generation and Application of Dynamic Standard Reference Intervals for Analysing Results of Comparative Genomic Hybridization // ISSN 1022-7954. - Russian Journal of Genetics. – 2013. - V. 49. - N. 10. – P. 1072–1077.
21. В.Г. Антоненко, М.Е. Миньженкова, Ю.О. Козлова, Ю.Ю. Коталевская, Е.А. Шестопалова, О.А. Кисленко, И.А. Казанцева, **Н.В. Шилова**, Т.В. Золотухина. Три случая синдрома Смит-Магенис у детей первого года жизни с врожденными пороками сердца // Медицинская генетика. – 2013. - Т.12. – С.44-48.

22. Kostyuk SV, Konkova MS, Ershova ES, Alekseeva AJ, Smirnova TD, Stukalov SV, Kozhina EA, **Shilova NV**, Zolotukhina TV, Markova ZG, Izhevskaya VL, Baranova A, Veiko NN. An exposure to the oxidized DNA enhances both instability of genome and survival in cancer cells. // PLoS One. – 2013. - Oct 17;8(10):e77469.
23. Миньженкова М.Е., **Шилова Н.В.**, Маркова Ж.Г., Козлова Ю.О., Золотухина Т.В. Эффективность различных методов диагностики хромосомных аномалий при репродуктивных потерях // Медицинская генетика. – 2014. – Т. 13 №2 (140). – С. 25-30.
24. Козлова Ю.О., Забненкова В.В., **Шилова Н.В.**, Миньженкова М.Е., Антоненко В.Г., Котлукова Н.П., Симонова Л.В., Казанцева И.А., Левченко Е.Г., Бомбардирова Т.Д., Золотухина Т.В., Поляков А.В. Клинико-генетическая характеристика синдромов делеции 22q11.2 // Генетика. – 2014. – Т. 50. – №5. – С. 602-610.
25. Золотухина Т.В., Канивец И.В., Коростелев С.А., **Шилова Н.В.**, Миньженкова М.Е., Козлова Ю.О., Демина Н.А., Бессонова Л.А., Галкина В.А., Маркова Ж.Г. Опыт использования комплекса современных методов исследования в конституциональной цитогенетике // Медицинская генетика. - 2014. - №12. – С. 22-28.

Методические рекомендации и авторские свидетельства

26. Золотухина Т.В., **Шилова Н.В.** Маркова Ж.Г. - Методы пренатального цитогенетического исследования // Методические рекомендации N 27. - Москва, Комитет здравоохранения. – 1997. - С. 1-12.
27. Золотухина Т.В., Евдокименков В.Н., Чивилев И.В., **Шилова Н.В.**, Маркова Ж.Г. - Автоматизированная комплексная программа пренатальной профилактики синдрома Дауна "Прогноз" // Авторское свидетельство. - 1998. N980175 от 01.06.1998.
28. Золотухина Т.В., Чивилев И.В., Евдокименков В.Н., **Шилова Н.В.**, Маркова Ж.Г. - Автоматизированная комплексная программа пренатальной диагностики синдрома Дауна ("ПРОГНОЗ") // Методические рекомендации N15. - Комитет здравоохранения г. Москвы. – 1998. - С.1-19.
29. Золотухина Т.В., **Шилова Н.В.**, Евдокименков В.Н., Маркова Ж.Г., Белковская М.Э. - Современные подходы к неинвазивной пренатальной диагностике синдрома Дауна // Методические рекомендации, МЗ РФ. – Москва – 2002. - С.1-20.
30. Золотухина Т.В., Мирошникова И.В., Маркова Ж.Г., **Шилова Н.В.**, Мельникова Л.Л. Алгоритм скринингового обследования женщин на синдром Дауна у плода в I триместре беременности // Методические рекомендации. – Москва - Деп здравоохранения – 2004. - С. 1-12.

Монографии и учебно-методические пособия

31. Золотухина Т.В. **Шилова Н.В.**, Юдина Е.В. – Пренатальная диагностика // Национальное руководство «Наследственные болезни» под редакцией акад. РАМН Бочкова акад. РАМН Гинтера Е.К., акад. РАМН Пузырева. - М.: ГЭОТАР -Медиа, 2012. – 936 с. - стр.798-832.
32. Золотухина Т.В., Мирошникова И.В., Маркова Ж.Г., **Шилова Н.В.**, Мельникова Л.Л. - Современные достижения и тенденции в пренатальной профилактике врожденных пороков развития и наследственных заболеваний // Методическое пособие под ред. В.Н.Чернышова, И.О.Крыжановской, С.И.Куцева. Ростов-на-Дону, 2004. – С. 38-43.
33. Гинтер Е.К., Золотухина Т.В., Антоненко В.Г., **Шилова Н.В.**, Цветкова Т.Г., Жулева Л.Ю. - Цитогенетические методы диагностики хромосомных болезней // Методическое пособие для врачей. - 2009. - Москва - С. 1-81.
34. Кошпаева Е.С., **Шилова Н.В.**, Иллариошкин С.Н., Колочкова Е.В., Исламов Р.Р. Медицинская генетика. Часть 2. Хромосомы человека. Цитогенетическая диагностика. // Учебно-методическое пособие. – Казань: КГМУ, 2014. – 44 с.

Публикации в других изданиях

35. **Shilova N.**, Zolotukhina T. Experience of usage of different DNA-probes in clinical cytogenetics // *Eur. J. Hum. Genet.* 2006. - V 14(S.1). - P 176.
36. **Shilova N.**, Zolotukhina T. An assessment of the use of interphase FISH in prenatal diagnosis // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2008. - V16(S.2). - P. 174-175.
37. **Шилова Н.В.**, Золотухина Т.В. Метод флуоресцентной in situ гибридизации (FISH) в пре- и постнатальной диагностике хромосомных aberrаций // Труды IV Съезда медицинских генетиков Украины. - 9-11 октября, 2008. – Львов. - стр. 14.
38. **Shilova N.**, Zolotukhina T. Unbalanced translocation (14;21) in the fetus as a result of a rare mode of paternal malsegregation // *Chromosome Research.* – 2009. – V. 17(S.1). - P. 205.
39. **Шилова Н.В.**, Миньженкова М.Е., Козлова Ю.О., Маркова Ж.Г., Золотухина Т.В. Использование различных вариантов FISH-метода в диагностике хромосомных болезней: выбор тактики исследования // Материалы VI Съезда Российского общества медицинских генетиков. - Ростов-на-Дону - 14-18 мая, 2010. - С.196.
40. **Шилова Н.В.**, Золотухина Т.В. Особенности пренатальной диагностики некоторых генетических синдромов при использовании молекулярно-цитогенетического подхода // Генетика человека и патология. Актуальные проблемы современной цитогенетики: сборник научных трудов. - под ред. В.П. Пузырева. - Вып. 9 – Томск, 2011. – 230 с. - С. 44-48.
41. **N. V. Shilova**, Y. O. Kozlova, M. E. Minzhenkova, E. V. Yudina, Z. G. Markova, T. V. Zolotukhina. Prenatal case of Pallister-Killian syndrome in conjunction with unbalanced t(15;18) // *Eur. J. Hum. Gen.* – 2012. - V. 20(S.1). – P. 382.
42. **Шилова Н.В.**, Маркова Ж.Г., Юдина Е.В., Миньженкова М.Е., Козлова Ю.О., Золотухина Т.В. Оценка эффективности выявления хромосомных аномалий у плода методом быстрой диагностики анеуплоидий по данным ретроспективного анализа / Материалы V Всероссийской конференции с международным участием «Пренатальная диагностика и генетический паспорт – основа профилактической медицины в век нанотехнологий» - С.-Петербург, 2012. - С. 123.
43. Золотухина Т.В., **Шилова Н.В.**, Миньженкова М.Е., Козлова Ю.О., Маркова Ж.Г., Цветкова Т.Г. Молекулярно-цитогенетическая характеристика малых сверхчисленных маркерных хромосом у плода / Архив клинической и экспериментальной медицины. - Украина, 2012. - Т. 21, - №2 - С. 164-167.
44. **Shilova N.**, Minzhenkova M., Markova Zh., Kozlova Y., Antonenko V., Tsvetkova T., Zolotukhina T. Characterization of 42 small supernumerary marker chromosomes by FISH method // *Eur. J. Hum. Genet.* - 2013. – V. 21(S.2). – J. 20.07. - P. 603.
45. **Shilova N.**, Minzhenkova M., Markova Zh., Chirkova E., Kozlova Yu., Tsvetkova T., Okuneva E., Makienko O., Zolotukhina T. Unbalanced interchromosomal insertions detected by molecular cytogenetic techniques // *Chromosome Research.* – 2013. – V. 21(S.1). - S1-S168.1.P7.
46. **Шилова Н.В.**, Канивец И.В., Миньженкова М.Е., Козлова Ю.О., Маркова Ж.Г. Структура геномного дисбаланса у пациентов с аномалиями фенотипа и нормальным кариотипом при стандартном цитогенетическом исследовании // Тез. докл. VII Съезда Рос. Общества мед. Генетиков. - С-Пб, 19-23 мая, 2015. - Мед. генетика. – 2015. – Т. 14. - №4 (154) – С. 44-45.
47. **Shilova N.**, Minzhenkova M., Kanivets I., Kozlova Y., Solonitchenko V., Markova Zh. – Apparently balanced de novo structural rearrangement of chromosome 10 in a boy with an abnormal phenotype // *Chromosome Research.* – 2015. – V. 23 (Issue 1 Supplement). – P. 157.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АВХ – аспирация ворсин хориона
 АРТ – аутомная реципрокная транслокация
 БДА – ускоренная (быстрая) детекция анеуплоидии
 ВЗ – воротниковая зона
 ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
 ИДП – инвазивная диагностическая процедура
 КФ-ПЦР – количественная флуоресцентная полимеразная цепная реакция
 КЦ – кордоцентез
 МВПР – множественные врожденные пороки развития
 млн.п.н. – миллион пар нуклеотидов
 мСМХ – малые сверхчисленные маркерные хромосомы
 п.н. – пара нуклеотидов
 ПГД – преимплантационная генетическая диагностика
 ПД – пренатальная диагностика
 ПЦД – пренатальная цитогенетическая диагностика
 СД – синдром Дауна
 СПК-синдром Паллистера-Киллиана
 т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов
 ТС – транслоцированный сегмент
 УЗИ- ультразвуковое исследование
 ХА – хромосомные аномалии
 ХБ – хромосомные болезни
 ХД – хромосомный дисбаланс
 ХМА – хромосомный микроматричный анализ
 ЦС – центрический сегмент
 ЭГМ - эхографические маркеры
 CEP – зонды на основе сателлитной ДНК (chromosome enumerator probes)
 CGH – сравнительная геномная гибридизация (comparative genomic hybridization)
 CNVs – вариации количества копий участков ДНК (copy number variations)
 FISH – флуоресцентная *in situ* гибридизация (fluorescence *in situ* hybridization)
 GTG – G-окраска с использованием трипсина и красителя Giemsa
 inv dup – инвертированная дупликация
 HAL - гаплоидная длина аутосом (haploid autosomal length)
 LSI – локус-специфичные ДНК-зонды (locus specific identifier)
 mBAND – многоцветный бэндинг хромосом
 M-FISH – 24-цветная FISH (multiplex FISH)
 MLPA - мультиплексная лигазная полимеразная цепная реакция
 PCR – частично окрашивающие ДНК-зонды (partial chromosome painting)
 WCP – цельнохромосомные ДНК-зонды (whole chromosome painting)