

# Цитогенетическая диагностика: особенности постнатального кариотипирования

Л.В. Тавокина

Медицинский Центр ТОВ «Исида-IVF», г. Киев

Хромосомные болезни – это тяжелые заболевания, которые, как правило, сопровождаются инвалидизацией пациентов. Медико-генетическое консультирование предполагает комплекс профилактических мероприятий по предупреждению появления таких пациентов в семьях. Для диагностики этих заболеваний используют традиционное кариотипирование в сочетании с различными техниками метода FISH. В обзоре автор детально останавливается на особенностях хромосомного анализа при постнатальном кариотипировании:

- основной принцип хромосомного анализа;
- особенность преаналитического этапа исследований;
- алгоритм цитогенетической диагностики;
- показания для проведения хромосомного анализа.

**Ключевые слова:** хромосомные болезни, кариотипирование, FISH-метод.

В настоящее время не вызывает сомнений тот постулат, что ни одна врачебная специальность не может обойтись без знаний основ медицинской генетики, так как наследственные болезни могут поражать все органы и системы органов человека. И первыми, кто сталкиваются с имеющимися у плода, а затем – у новорожденного, генетическими проблемами, естественно, являются врачи акушеры-гинекологи, неонатологи, педиатры и врачи семейной медицины.

**Наследственные болезни** – это заболевания, возникновение и развитие которых связано с изменениями (мутациями) генетического материала клетки. От наследственных заболеваний следует отличать **врожденные заболевания**, которые обусловлены внутриутробными повреждениями, вызванными, например, инфекцией или воздействием других факторов на плод во время беременности.

Ключевым моментом медицинской генетики является совершенствование и разработка новых, более точных методов, которые позволяют проводить дифференциальную диагностику с целью лечения и профилактики наследственных болезней человека.

**Таким образом, генетическое тестирование дает ответ на два главных вопроса:**

1. Врожденная или наследственная природа выявляемых пороков развития?

2. На каком уровне произошла поломка/нарушение?

В настоящее время генетическая диагностика возможна на нескольких уровнях:

- а) геном (обнаружение мутаций в молекуле ДНК);
- б) хромосомном (обнаружение нарушения в структуре упакованной с помощью белков компактной молекуле ДНК, т.е. хромосоме);
- в) геномном (геном-совокупность всего наследственного материала, заключенного в клетке организма);
- г) эпигеномном (обнаружение нарушений во взаимодействии между геномом и продуктами его работы, т.е. нарушениях в регуляции работы генов).

В данной работе мы остановимся только на **цитогенетической диагностике, или диагностике на уровне хромосом.**

«Хромосома» в буквальном переводе означает «окрашенное тело», поскольку основные красители хорошо связываются хромосомами. Хромосомы – это структуры в ядре клетки, состоящие из ДНК и белка, которые сохраняют, реализуют и передают наследственную информацию следующему поколению. Хромосомы доступны для исследования в световом микроскопе только во время деления клетки. **Кариотип** – совокупность признаков (число, морфология и др.) полного набора хромосом, присущая клеткам данного организма или линии клеток (клон). **Кариотипирование** – традиционный цитогенетический метод, который позволяет выявлять отклонения в структуре и количестве хромосом. GTG-бэндинг – основная техника дифференциального окрашивания хромосом по длине. Метод FISH (флуоресцентная гибридизация in situ) – метод молекулярной цитогенетики, с помощью которого выявляются незначительные перестройки в хромосомах, которые не обнаруживаются традиционными цитогенетическими методами. Другими словами, это метод, дополняющий кариотипирование.

В норме кариотип человека состоит из 46 хромосом – 22 пары аутосом и две половые хромосомы: женский кариотип – 46, XX, мужской кариотип – 46, XY. Для клинической цитогенетики имеют значение:

а) **постнатальное** кариотипирование – определение кариотипа пациента в лимфоцитах периферической крови;

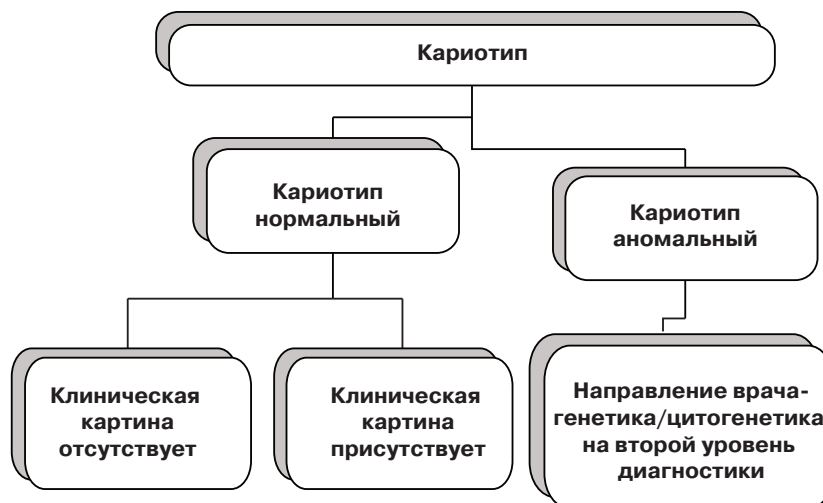
б) **пренатальное** кариотипирование – исследование хромосом плода, которое проводится по клеткам околоплодных оболочек (хорион/плацента), околоплодным водам и в более поздние сроки – по пуповинной крови плода.

**Хромосомные синдромы** – это заболевания, обусловленные изменениями в количестве (**анеуплоидии**) или в структуре отдельных хромосом в кариотипе пациента. Эти поломки возникают в результате мутаций в половых клетках родителей или могут передаваться от родителей – носителей сбалансированных хромосомных перестроек детям. Частота хромосомных аномалий среди новорожденных составляет 5–7 на 1000 [1], в группе пациентов с репродуктивными проблемами – 5–7% [2], а в группах детей с задержкой умственного развития она гораздо выше – 8–20%, по данным разных авторов.

В основном хромосомные синдромы характеризуются наличием у пациента:

- а) различных нервно-психических расстройств;
- б) множественных врожденных пороков развития (МВПР) систем и органов, нарушения полового развития;
- в) различных стигм дисэмбриогенеза (незначительные анатомические отклонения);
- г) отставания в росте и развитии (пренатальное или постнатальное).

Хромосомные синдромы – это очень тяжелые заболевания, которые, как правило, не поддаются терапевтической коррекции. А пациенты с такими заболеваниями являются инвалидами. Поэтому очень важно, чтобы диагностика этих болезней проводилась своевременно, а генетическое тестирование выполнять в соответствии с мировыми стандартами.



### Первый уровень исследований (кариотипирование)

Основной принцип цитогенетической диагностики состоит в выяснении:

а) характера обнаруженных в кариотипе пациента изменений хромосом – **сбалансированный или несбалансированный**;

б) происхождения хромосомной перестройки в кариотипе пробанда – **родительское** (один из родителей является носителем) или она возникла **впервые (de novo)**.

От ответа на эти два главных вопроса зависит прогноз для пробанда и профилактика рождения в данной семье потомства с хромосомной патологией.

Нарушения в хромосомах происходят при гаметообразовании в период редукционного деления, когда во время конъюгации может возникнуть не расхождение хромосом, ведущее к **увеличению / уменьшению их числа или к структурным перестройкам**. Возможно также нарушение в одной из клеток в период дроблений зиготы или на более поздних стадиях развития. В таких случаях только часть клеток содержит аномальный кариотип и говорят о хромосомном **мозаицизме**. При этом клиническая картина может быть менее выраженной. Все возможные варианты изменений описаны в Международной номенклатуре хромосом (ISCN), которая является унифицированным руководством для цитогенетиков всего мира.

Возникшие спонтанно под воздействием различных факторов числовые изменения в кариотипе зародыша приводят к уменьшению (моносомия) или увеличению (трисомия) числа копий той или иной хромосомы. Теоретически это может произойти с любой хромосомой, но продолжительность жизни зародышей с аномалиями разных хромосом неодинакова. Из наиболее часто встречающихся хромосомных болезней у новорожденных диагностируют болезнь Дауна (три копии 21 хромосомы), синдромы Патау (три копии хромосомы 13), Эдвардса (три копии хромосомы 18), Тернера (только одна копия половой хромосомы X), синдром Клайнфельтера (две копии хромосомы X вместо одной в мужском кариотипе). При подозрении на хромосомную природу заболевания рекомендована консультация врача-генетика, который назначает пациенту традиционное кариотипирование. Оно проводится по лимфоцитам крови и сделать это можно еще в роддоме, поскольку при некоторых синдромах продолжительность жизни составляет дни/часы.

Наиболее простым, доступным в клинической цитогенетике является анализ хромосом по лимфоцитам периферической крови. Достаточно 2 мл цельной венозной гепаринизированной крови, взятой стерильно. Наилучший способ взятия образца с

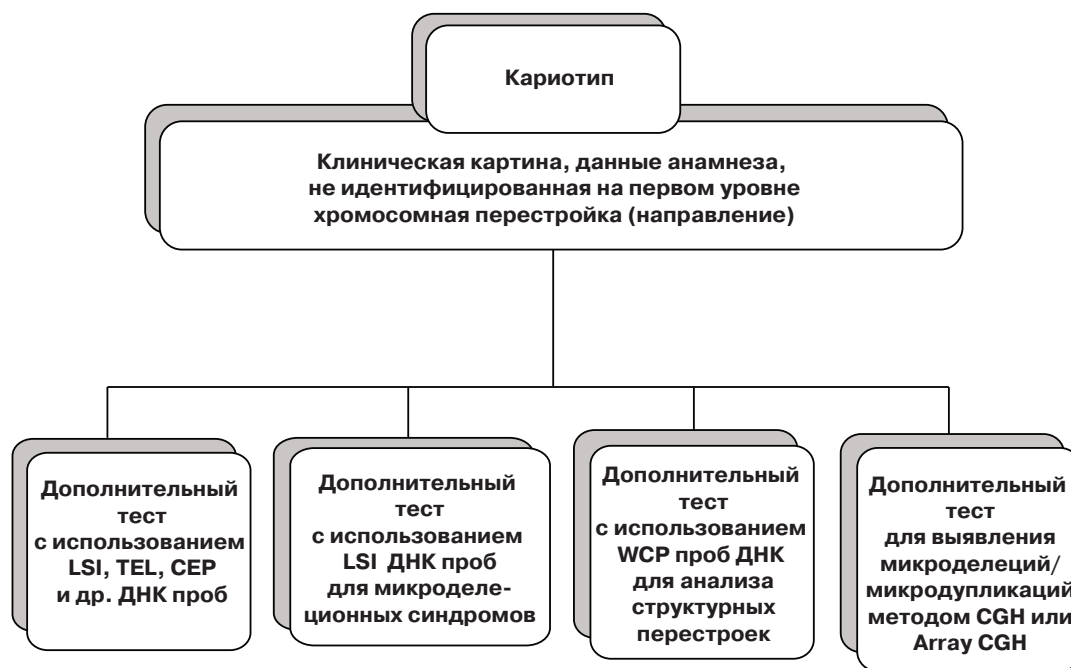
помощью моноветы (Sarstedt Monovette, Li-Heparin LH/2.7ml), поскольку он позволяет максимально избежать инфицирования, что является одним из условий дальнейшего успешного культивирования клеток. Моновет со взятой кровью тщательно перемешивают и маркируют (Ф.И.О., дата рождения, дата и время забора). Такой образец сохраняют и доставляют в лабораторию при температуре 4–8 °С в течение суток. **Нарушение температурного режима категорически запрещено.**

Анализ проводят не натощак. Но за 1–2 дня из рациона пациента необходимо исключить жирную, жареную пищу, алкоголь, за 2 нед – прием антибиотиков, химиотерапевтических, гормональных препаратов и др. Забор крови у больных с острым вирусно-респираторным заболеванием проводят не раньше чем через 14 дней после выздоровления. Все эти меры предосторожности необходимы для того, чтобы избежать низкого митотического индекса культуры лимфоцитов, а, значит, и повторного взятия крови. Митотический индекс (МИ, %) – процент делящихся клеток от общего числа проанализированных. И все же в небольшом проценте случаев существует риск низкого индивидуального МИ и пациенту назначают повторный забор крови.

Непригодной для анализа является гемолизированная или хилезная кровь, а также кровь со сгустками. Особенно «сложной» для кариотипирования является кровь новорожденных. По объяснимым причинам она чаще бывает с перечисленными выше дефектами, в недостаточном количестве и требует повторного взятия образца. Провести хромосомный анализ тяжелым детям, которые **вынужденно должны находиться на поддерживающей инфузионной терапии, практически невозможно. Им назначают повторное кариотипирование**, которое проводят после выписки из роддома спустя какое-то время. Поскольку набор хромосом во всех клетках индивидуума теоретически одинаков и не меняется в течение жизни, можно говорить о «хромосомном паспорте», а также рекомендовать пациенту хранить полученное изображение хромосом с цитогенетическим заключением и без необходимости не прибегать к повторному исследованию.

### Алгоритм цитогенетической диагностики

**Нормальный кариотип**, полученный в результате GTG-бэндинга и компьютерного анализа, не требует дополнительного исследования. Это так называемый **первый уровень** цитогенетической диагностики. Но если в кариотипе найдены отклонения, которые требуют более детального исследования или имеет место **несоответствие клинической картины и кариотипа**, врач-цитогенетик рекомендует исследование



### Второй уровень исследований (методы FISH)

Примечание: LSI – локус-специфические, Tel – теломерные, CEP – центромерные пробы ДНК; WCP – пробы на всю хромосому; CGH – сравнительная геномная гибридизация, Array CGH – чиповая техника

второго уровня. **Второй уровень** – это уточняющее дополнительное исследование с более высокой разрешающей способностью (можно идентифицировать фрагмент хромосомы менее 7–10 млн пар н. о. ДНК). На этом уровне проводят диагностику методом FISH, который позволяет исследовать незначительные перестройки хромосом, не выявляемые простым кариотипированием. Поскольку стоимость FISH-исследования выше, чем при обычном кариотипировании, и число техник с каждым годом растет, желательно в каждом конкретном случае обсуждать с врачом-цитогенетиком протокол уточняющего теста (рисунок).

#### Какие тесты следует рекомендовать пациенту?

Синдромы, которые вызваны изменением числа хромосом в кариотипе, как правило, хорошо диагностируются простым кариотипированием. Только в тех случаях, когда клиническая картина предполагает мозаицизм, лучше прибегнуть к **дополнительному** исследованию FISH-методом, чтобы определиться с размером аномального клона. Например, при диагностике синдромов Клайнфельтера и Тернера необходимо помнить о хромосомном мозаицизме, который в некоторой мере будет определять как клиническую картину, так и репродуктивный потенциал пациента. Следует отметить, что при синдроме Тернера важно выяснить не только соотношение нормального (46, XX) и аномального (45, X) клонов клеток но и не пропустить, если такой имеется, клон клеток с Y-хромосомой (кариотип 46, XY) или какими-либо ее структурными аберрантными вариантами (аберрация – тип мутации, который изменяет структуру хромосом). При этом синдроме пациенты с Y-хромосомой входят в группу повышенного риска по развитию гонадобластом, которые могут давать начало инвазивным новообразованиям из зародышевых клеток, чаще всего дисгерминамам. Поэтому наличие подтвержденного мозаицизма 45, X/46, XY – показание для удаления такой гонады.

Отдельно необходимо сказать о **структурных перестройках хромосом**. Среди них есть те, которые хорошо идентифицируются в световом микроскопе, не вызывают со-

мнений у цитогенетиков при установлении диагноза и не нуждаются во втором уровне исследований. Изменения структуры хромосом – это нарушение целостности молекулы ДНК хромосомы и выглядит это по-разному: потеря материала (делеция), перемещение участка одной хромосомы на другую или обмен хромосом участками (транслокация), двойной разрыв и поворот сегмента хромосомы на 180° (инверсия), дополнительный в кариотипе фрагмент какой-либо хромосомы (маркерная) и многие другие.

Все структурные изменения хромосом можно разделить на два типа: **сбалансированные и несбалансированные**, что в свою очередь приводит к **сбалансированным или несбалансированным кариотипам [1]**. Несбалансированные хромосомные перестройки (делеции, дупликации, инсерции-вставки, сверхчисленные маркерные хромосомы и др.), как правило, имеют клиническую картину проявления. Напротив, пациенты со сбалансированными перестройками в так называемом сбалансированном кариотипе могут даже не подозревать о своих «скрытых» проблемах, поскольку они фенотипически (**фенотип** – проявление кариотипа) нормальны и здоровы. К таким хромосомным перестройкам относятся транслокации (Робертсоновские и множество реципрокных), инверсии и некоторые другие аберрации. Для пациентов-носителей существует повышенный риск рождения больного ребенка с несбалансированной перестройкой. **Маркерами повышенного риска** для этой группы пациентов являются бесплодие (первичное /вторичное), привычное невынашивание, рождение ранее в семье ребенка с МВПП, умственной отсталостью и др. Поэтому задача цитогенетиков состоит в установлении типа перестройки с максимально точной локализацией точек разрывов на хромосоме. На этом этапе может понадобиться FISH-исследование второго уровня с использованием различных проб ДНК. Важно также правильно интерпретировать полученные результаты, обязательно указав на соответствие/несоответствие их причине обращения пациента. При проведении анализа неоплачиваемую помощь оказывает максимально информативно составленное врачами других специальностей **направление**.

Некоторые нозологические формы, сопровождающиеся микроструктурными аномалиями хромосом

Синдром	Хромосомная аномалия	№	Синдром	Хромосомная аномалия
К.де Ланге	del (3)(q26)	8	Прадера-Вилли	del (15)(q11.2- q13)
Вольфа-Хиршорна	del (4)(p16)	9	Ангельмана	del (15)(q11.2- q13)
"Кошачьего крика"	del (5)(p15.5)	10	Смита-Магениса	del (17)(q11.2)
Вильямса	del (7)(q11.2)	11	Миллера-Дикера	del (17)(q13.3)
Смита-Лемли-Опитса	del (7)(q31)	12	ДиДжорджи и велокардиофациальный	del (22)(q11.21)
Лангера-Гидиона и ТРФС1	del (8)(q24.1)	13	"Кошачьего глаза"	del (22)(q11.2)
Видеманна-Беквита	dup(11)(p15.3)	14	Мышечные дистрофии Дюшена и Беккера	del (X)(q22.1)

Примечание: del – делеция, dup-дупликация, p – короткое плечо хромосомы, q – длинное плечо хромосомы.

Как правило, исследование кариотипа ребенка с той или иной хромосомной аномалией считается завершенным только после кариотипирования родителей и выяснения природы происхождения данной перестройки (материнское/отцовское или de novo). Это важно не только для пробанда, но и для пренатальной профилактики хромосомной патологии при последующих беременностях.

Например, при транслокациях обмена между двумя хромосомами, найденной у родителя-носителя, ребенок может унаследовать такую же пару измененных хромосом. Тогда его кариотип аналогичен кариотипу здорового родителя-носителя, и в 95% он будет здоров. Но если пробанд унаследовал только одну хромосому из пары измененных, то кариотип следует считать несбалансированным и ребенок будет болен. В случае же, когда ребенок со сбалансированным, как у родителя-носителя, кариотипом имеет аномалии развития или умственную отсталость, необходим поиск микроделеций/микродупликаций как в точках разрывов хромосом, так и в целом геноме, не выявляемых кариотипированием. Таким пациентам показана диагностика методом сравнительной геномной гибридизации (CGH или Array-CGH), который позволяет диагностировать анеуплоидии и микроструктурные аномалии одновременно во всех хромосомах. В настоящее время использование микрочиповых технологий, позволяет дополнительно приблизительно в 6% случаев обнаружить хромосомные микроаномалии при нормальном/сбалансированном кариотипе пациента.

Диагностика второго уровня FISH методом также показана при **микроделеционных синдромах** (МС) (таблица). Частота возникновения большей части МС крайне невелика: порядка 1 случая на 50–100 тыс. новорожденных. Как правило, потери небольших фрагментов генетического материала не видимы в световой микроскоп и нуждаются в исследовании **второго уровня** методом FISH с использованием locus-специфических (LSI) ДНК проб к критическим регионом того или иного МС. **Важно акцентировать внимание на следующем:** кариотипирование при МС исключает наличие в кариотипе какой-либо **макроперестройки** (например, транслокации), которые могли задеть критические регионы для определенного МС, FISH же с LSI ДНК-пробами – наличие микроделеции. Но приблизительно в 25% случаев при наличии клинической картины синдрома не удается обнаружить каких-либо макро/микроизменений в кариотипе. В таких случаях можно предполагать присутствие эффекта геномного импринтинга и возможных однородительских дисомий (т.е. происхождение пары гомологичных идентичных хромосом диплоидного организма из генома одного из родителей). Это можно рассматривать как **эпигеномный уровень** диагностики работы генов. Например, у 20–30% больных с синдромом Прадера-Вилли с помощью методов ПЦР обнаруживают две копии материнской 15-й хромосомы при отсутствии копии отцовской. Это и определяет клинику синдрома при абсолютно нормальном кариотипе.

Поэтому поиск мутаций по небольшим генным локусам (методы ПЦР, FISH) при клинической картине МС не исключает кариотипирование, а дополняет его. То же касается и некоторых других хромосомных синдромов. Например, синдром Мартина-Белла или ломкой X-хромосомы характеризуется ее фрагильностью в сегменте Xq27.3, которая выявляется в специальных условиях культивирования клеток в среде с дефицитом фолиевой кислоты. Фрагильный сайт получил обозначение FRAXA, а расшифрованный ген – FMR1 (англ. – Fragile site Mental Retardation). Этот ген связан с развитием умственной отсталости 1-го типа. Хотя более точным в диагностике данного синдрома является метод ПЦР, все же он не исключает кариотипирования по выявлению структурных перестроек в кариотипе такого пациента.

Подобным образом поступают с локусом SRY (Sex-determining Region Y), который определяет развитие по мужскому типу и расположен в коротком плече Y-хромосомы (Yp11.3). При потере этого участка или генных мутациях в нем фенотип будет женский при мужском кариотипе 46, XY (Синдром Свайера). Напротив, при женском кариотипе 46, XX, но присутствии встроенного в результате транслокации в X-хромосому или даже аутосому (не половая хромосома) локуса с геном SRY, фенотип будет мужским (синдром Де ля Шапеля). Поэтому при несоответствии пола пациента и его кариотипа необходимо продолжить диагностику по поиску SRY-локуса FISH-методом или мутаций в этом локусе – методами ПЦР.

Учитывая тяжесть хромосомных болезней и особенности психики пациентов с такими заболеваниями, Приказом № 641/84 МЗ Украины от 31.12.2003 регламентировано их консультирование в ходе цитогенетической диагностики: заключение с аномальным кариотипом должен разъяснить пациенту только врач-генетик.

Таким образом, хромосомные болезни – это тяжелые заболевания, которые, как правило, сопровождаются инвалидизацией пациентов. Медико-генетическое консультирование предполагает комплекс профилактических мероприятий по предупреждению появления таких пациентов в семьях. Одним из видов диагностики этих заболеваний является цитогенетическая диагностика – комплекс традиционного кариотипирования и различных техник метода FISH. Показанием для такого тестирования является МВПР/микроаномалии, различные нервно-психические нарушения, нарушения полового развития (интерсексуализм, раннее половое созревание или его задержка, крипторхизм), различные стигмы дисэмбриогенеза (особенно лица, половых органов, конечностей), внутриутробное и постнатальное отставание в росте и развитии, аутизм, задержка речи, трудности в обучении. Успешность лечебных и профилактических мероприятий зависит от совместных усилий врачей-генетиков, акушеров-гинекологов, неонатологов, педиатров, семейных врачей, а также от врачей-цитогенетиков, гарантирующих достоверность результатов исследований.

**Цитогенетична діагностика: особливості  
постнатального каріотипування  
Л.В. Тавокіна**

Хромосомні хвороби – це важкі захворювання, які, як правило, супроводжуються інвалідизацією пацієнтів. Медико-генетичне консультування передбачає комплекс профілактичних заходів з попередження появи таких пацієнтів в сім'ях. Для діагностики цих захворювань використовують традиційне каріотипування у поєднанні з різними техніками методу FISH. В огляді автор детально зупиняється на особливостях хромосомного аналізу при постнатальному каріотипуванні:

- основний принцип хромосомного аналізу;
- особливість преаналітичного етапу досліджень;
- алгоритм цитогенетичної діагностики;
- показання для проведення хромосомного аналізу.

**Ключові слова:** хромосомні хвороби, каріотипування, FISH-метод.

**Cytogenetic Diagnosis :  
features postnatal karyotyping  
L.V. Tavokina**

Chromosomal diseases are heavy illness, which, as a rule, are accompanied invalidization of patients. The counseling suppose the complex of preventive measures on prediction of such patients appearance in families. For diagnostics of these diseases traditional karyotyping is used in combination with the different techniques of method of FISH. In a review an author in detail decides on the features of chromosomal analysis at postnatal karyotyping:

- basic principle of chromosomal analysis;
- specifics of the preanalytical stage of researches
- indications for chromosomal analysis

**Key words:** chromosomal diseases, karyotyping , FISH-method.

**Сведения об авторе**

**Тавокіна Любов Васильевна** – Медицинский центр ООО «Исида-IVF», 03126, г. Киев, бул. И. Лепсе, 65; тел.: (044) 455-88-11. E-mail: L\_Tavokina@isida.ua

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека//Санкт-Петербург. – 2007. – 639 с.
2. Тавокіна Л.В., Баронова Е.В., Сопко Н.И. Наиболее часто встречающиеся хромосомные аномалии в карิโอטיפах пациентов с репродуктивными нарушениями //Цитология и генетика. – 2007. – Т. 41, № 4. – С. 48–55.
3. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. Медицинская цитогенетика. – М.: МЕДПРАКТИКА, 2006. – 300 с.

*Статья поступила в редакцию 03.09.2015*

**Все указанные в статье лабораторные исследования выполняются  
в Медицинской лаборатории Синэво**