

© Т. В. Золотухина, Е. В. Юдина,
Н. В. Шилова, М. Е. Миньженкова,
Ю. О. Козлова, Ж. Г. Маркова

ФГБУ «Медико-генетический научный
центр» РАМН, г. Москва

СПЕКТР РЕДКИХ ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ, ВЫЯВЛЕННЫХ ПРЕНАТАЛЬНО У ПЛОДОВ С УВЕЛИЧЕННЫМ ВОРОТНИКОВЫМ ПРОСТРАНСТВОМ

УДК: 618.33-07:575

■ Представлены данные, иллюстрирующие целесообразность молекулярно-цитогенетического подхода при пренатальной диагностике редких хромосомных аномалий у плодов с увеличенным воротниковым пространством, выявленным при УЗИ в I триместре беременности. FISH-методом были выявлены: микроделеция 22q11.2, r(13)(p11q22), dup(8)(p23p12), del(13)(q34), invdupY(q10), две малые сверхчисленные маркерные хромосомы производные 5 и 20 хромосом. В целях повышения эффективности выявления редких хромосомных аномалий подчеркнута значимость накопления и систематизации «мягких» УЗ-маркеров у плодов с подозрением на микроперестройки хромосом и расширение использования для их диагностики FISH-метода.

■ **Ключевые слова:** расширенное воротниковое пространство; пренатальная диагностика; редкие хромосомные аномалии.

Хромосомные аномалии (ХА) являются одной из наиболее частых форм врожденных и наследственных заболеваний человека. Основным методом пренатальной диагностики ХА является цитогенетический анализ материала (амниотическая жидкость, ворсины хориона или плаценты, пуповинная кровь), полученного в ходе инвазивных вмешательств (амниоцентез, аспирация ворсин хориона или плаценты, кордоцентез).

В пренатальной диагностике ХА традиционно существует проблема обоснованного формирования группы риска по ХА у плода, чтобы не пропустить эту патологию и не проводить необоснованные инвазивные исследования. Для отбора на пренатальное кариотипирование учитываются различные факторы риска, в частности эхографические маркеры или пороки развития у плода.

В ранние сроки беременности обнаружение фенотипических особенностей, характерных для того или иного генетического синдрома, бывает затруднено. В большинстве случаев в ходе ультразвукового исследования (УЗИ) у плода могут быть выявлены либо пороки развития, либо «мягкие» УЗ-маркеры, при которых могут быть заподозрены как крупные ХА, хорошо различимые при микроскопии, так и мелкие структурные аберрации или нормальный кариотип, требующие дополнительного исследования. В этих случаях «классический» (GTG-метод) цитогенетический анализ может быть недостаточным для постановки точного диагноза, а заранее спланировать расширенное молекулярно-цитогенетическое исследование плода сложно, т. к. всегда имеется ограничение инвазивного материала.

Тактика пренатальной диагностики частых хромосомных анеуплоидий отработана и включает кариотипирование плодов у женщин группы риска, сформированной при неинвазивном скрининге или при УЗИ плода. Диагностика более редких хромосомных синдромов, обусловленных мелкими структурными ХА (микроделециями или микродупликациями) требует использования дополнительных молекулярных методов исследования. В постнатальном периоде эти синдромы часто сопровождаются задержкой развития, умственной отсталостью (УО), широким спектром неспецифических лицевых дисморфий и составляют значительную долю хромосомной патологии среди пациентов с недифференцированной УО. Их диагностика возможна лишь при использовании современных молекулярных методов (FISH, CGH, MLPA). В пренатальном периоде основную информацию о патологии плода можно получить лишь при использовании высокочувствительного экспертного УЗИ, когда выявляются «мягкие» УЗ-маркеры или увеличенное воротниковое пространство (ВП) у плода.

Ретроспективный анализ результатов 270 случаев пренатальной цитогенетической диагностики, когда показанием к кариотипированию являлось обнаружение у плодов рас-

ширенного ВП в качестве изолированного маркера, показал, что при значениях ВП выше 95-го процентиля ХА выявлены в 38% наблюдений и были представлены в основном числовыми ХА. Причем трисомия по 21 хромосоме была обнаружена в большинстве из них (60,8%) [1].

Известно, что расширенное ВП является полипотенциальным фактором риска, поскольку при этом у плодов увеличивается не только частота ХА, но и пороков развития неясной этиологии. В среднем у 15% плодов с расширенным ВП в I триместре и нормальным кариотипом позже выявляются различные пороки развития. Этот показатель существенно выше, чем в популяции, и резко увеличивается с ростом абсолютных значений величины ВП. Спектр пороков развития при увеличенном ВП очень разнообразен. В частности, показано, что риск обнаружения патологии сердечно-сосудистой системы у плодов с расширенным ВП выше, чем других пороков [7, 8]. В качестве иллюстраций диагностических возможностей молекулярно-цитогенетического подхода мы приводим 6 случаев использования FISH-метода при пренатальной диагностике редких ХА у плодов с увеличенным ВП.

Материал и методы

Оценку толщины ВП проводили трансабдоминальным и/или трансвагинальным доступом с использованием ультразвуковых аппаратов среднего и экспертного уровня (HDI 5000, EnVisor фирмы Филипс, X8 фирмы Медисон, E8 фирмы GE). Измерение ВП осуществлялось по следующим правилам: 1) в интервале от 11 до 14 нед., 2) при копчиково-теменном размере от 45 до 85 мм, 3) строго в сагиттальной плоскости, 4) при максимальном увеличении изображения головы и верхней трети туловища плода. Критерием отбора пациенток на пренатальное кариотипирование было превышение размера ВП более 95-го процентиля нормативных значений для данного срока [1].

Объектом цитогенетического исследования были ворсины хориона, полученные в результате трансабдоминальной аспирации в I триместре (11–14 нед.). В тех случаях, когда при расширенном ВП инвазивная диагностика в I триместре по ряду причин не проводилась, в сроке 20–22 недель проводился кордоцентез. Цитогенетический анализ ворсин осуществлялся «полупрямым» методом. Исследование хромосом во II триместре проводилось на препаратах ФГА-стимулированной культуры лимфоцитов пуповинной крови стандартным методом. Помимо стандартного цитогенетического исследования плодного материала, в представленных 6 случаях было проведено и молекулярно-цитогенетическое исследование (FISH-метод) с соответствующими ДНК-зондами.

Флуоресцентную *in situ* гибридизацию осуществляли по стандартному протоколу фирм-производителей с использованием соответствующих ДНК-зондов: ToTelVysion Kit, TelVysion 13q, LSI 13, TUPLE1/ARSA, CEP Y (Abbott Molecular). Также были использованы многоцветные технологии FISH: mFISH и mBAND на хромосомы 5 и 20 (MetaSystems).

FISH-анализ осуществлялся на люминесцентном микроскопе AxioImagerM1 (ZEISS) с использованием программы цифрового анализа изображения Isis (MetaSystems, Germany).

Результаты и обсуждение

Неожиданным оказалось обнаружение среди плодов с увеличенным ВП в I триместре шести случаев редких структурных ХА. (Таблица 1). Все эти наблюдения, выявленные в I триместре, требовали дальнейшего мониторинга беременности посредством УЗИ плода и уточнения кариотипа при кордоцентезе. При УЗИ плодов во II триместре выявлялись и другие нарушения развития: внутриутробная задержка развития (ВЗР),

Таблица 1

Результаты FISH-диагностики редких хромосомных аномалий

	Данные УЗИ	GTG-кариотип	FISH-зонды	Результаты FISH-анализа	Геномный дисбаланс
1	Увеличение ВП	add(8)(p23)	mFISH	dup(8)(p23p12)	дупликация 8p12→p23
2	Увеличение ВП	r(13)?	LSI 13 (q14) Tel Vysion (13q)	r(13)(p11q22)	делеция 13p11→pter 13q22→qter
3	Увеличение ВП	N	ToTel Vysion	del (13)(q34)	делеция 13q34→qter
4	Увеличение ВП	der (Y)	CEP Y	i(Y)(q10)	дупликация Yq10→qter
5	Увеличение ВП	+mar1, +mar 2	mFISH, mBAND	+r(5)(p13.3q12), +r(20)(p11.2q12)	дупликация 5p13.3→q12 дупликация 20p11.2→q12
6	Киста шейного отдела	N	TUPLE1/ARSA	del (22)(q11.2)	делеция 22q11.2q11.2

пороки сердечно-сосудистой системы, пороки развития мочевой системы, лицевые дисморфии и другие.

Случай 1. При стандартном кариотипировании у плода выявлен дополнительный материал на коротком плече хромосомы 8, который был обозначен как add (8p). Позже, в сроке 22 недели беременности при УЗИ у плода были выявлены кисты сосудистых сплетений, гипоплазия червя мозжечка, гиперэхогенные включения в области сердца, ВЗР. При использовании mFISH-метода дополнительный материал на хромосоме 8 был идентифицирован как дублированный, принадлежащий хромосоме 8. Кариотипы родителей нормальные. Кариотип плода соответствовал 46, XY, dup (8) (p23p12)dn. При повторном более тщательном анализе GTG-окрашенных препаратов точки разрывов на коротком плече хромосомы 8 были уточнены, а сама ХА интерпретирована как инвертированная дупликация участка p23p12 хромосомы 8, возникшая de novo.

Случай 2. В кариотипе плода отсутствовал второй гомолог хромосомы 13, но имелась маленькая дериватная хромосома, предположительно кольцевая r (13). В сроке 19 недель у плода развилась выраженная ВЗР на 3–4 недели, гиперэхогенные включения в желудочке сердца. FISH-анализ культуры лимфоцитов пуповинной крови с ДНК-зондами LSI (13q14) и TelVysion 13q позволил установить, что дериватная хромосома 13 действительно являлась кольцевой r (13) (p11q22), сопровождалась частичной делецией ее длинного плеча del (q22→qter).

Случай 3. При стандартном GTG-анализе кариотип плода был нормальный. Кроме увеличенного ВП, позже у плода выявили гипоплазию носовой кости, микрогнатию, гидроперикард, гиперэхогенный кишечник, олигодактилию кистей, ВЗР. FISH-анализ культуры лимфоцитов пуповинной крови с ДНК-зондами на теломерные участки всех хромосом (ToTelVysion) установил субтеломерную делецию в длинном плече хромосомы 13 — del (13) (q34), которая была уточнена зондом tel13q. Диагностика подобных терминальных микроделеций возможна только с применением молекулярных методов, т. к. при GTG-методе они визуально не выявляются.

Случай 4. При стандартном GTG-анализе у плода обнаружена дериватная равноплечная хромосома Y. Кроме увеличенного ВП у плода в 15 недель других УЗ-маркеров обнаружено не было. При FISH-анализе культуры лимфоцитов пуповинной крови с использованием зонда на центромерный участок хромосомы Y (DYZ3) эта ХА была идентифицирована как дицентрическая изохромосома idic (Y) (q10).

Случай 5. При GTG-анализе у плода обнаружены две малые сверхчисленные маркерные хромосомы (mCMX) неясного происхождения. В сроке 20 недель у плода развилась выраженная ВЗР (отставание на 3–4 недели). В результате последовательных многоцветных FISH-исследований культуры лимфоцитов пуповинной крови (cen-mFISH, mFISH, mBAND5, mBAND20) было установлено происхождение этих mCMX. Они оказались кольцевыми хромосомами с соответствующими частичными дупликациями районов хромосом 5 и 20 и содержали значительное количество эухроматинового материала этих хромосом. Дупликация большого числа генов, локализованных в этих участках хромосом, привело к формированию в данном наблюдении выраженной ВЗР у плода. Кариотип плода выразился как: 48, XY,+r (5) (p13.2q11.2),+r (20) (p11.1q12).

Случай 6. При УЗИ плода 39-летней женщины в 13 недель выявлено круглое анэхогенное включение в области шеи диаметром 6,7 мм. Кариотип плода GTG-методом определен как нормальный. Учитывая сообщения о том, что увеличенное ВП у плодов может сопровождаться сердечно-сосудистой патологией, среди которой возможно обнаружение синдромов, обусловленных делецией 22q11.2 (22q11.2DS), мы провели FISH-исследование культуры лимфоцитов пуповинной крови с ДНК-зондом TUPLE1/ARSA, маркирующим критический регион q11.2 хромосомы 22, и обнаружили микроделецию в этом регионе.

После медико-генетического консультирования, учитывая неблагоприятный витальный прогноз, во всех представленных случаях семьи приняли решение прервать беременность.

Типичным примером целесообразности использования FISH-метода для уточнения хромосомных перестроек у плода является наличие дериватных хромосом в кариотипе и множественных пороков развития, выявленных при УЗИ. В данной статье представлены наблюдения, когда по первичному показанию — увеличенное ВП у плода в I триместре беременности, возникла необходимость использования расширенного молекулярно-цитогенетического исследования плода. Очевидно, дисбаланс по отдельным участкам различных хромосом, как аутосом, так и гоносом, сопровождаемый аномальным количеством копий генов, может приводить к возникновению одного наиболее общего признака — увеличенного ВП, который диагностируется уже на ранних этапах эмбриогенеза.

При этом в результате FISH-анализа в двух наблюдениях (случаи 3 и 6) при нормальных кариотипах, диагностированных GTG-методом, выявлены две разные микроделеции — (13)

(qter-) и 22q11.2. Наблюдения, когда при УЗ-отклонениях или пороках развития GTG-методом определяется нормальный кариотип плода, вызывают беспокойство и целесообразность использования FISH-метода для уточняющей диагностики и выявления возможных микроперестроек хромосом.

Суммарная частота микроделеционных синдромов среди новорожденных достаточно высока. В постнатальном периоде общей чертой этих синдромов является умственная отсталость, задержка психомоторного развития разной степени, которые не могут быть диагностированы пренатально. Поэтому в пренатальный период при обнаружении различных стигм эмбриогенеза или «мягких» УЗ-маркеров у плодов с нормальным кариотипом расширенное молекулярно-цитогенетическое исследование могло бы способствовать выявлению микроделеционных синдромов.

Лучшим УЗ-критерием при подозрении 22q11.2DS у плода считаются конотрункальные аномалии [5]. В нашем исследовании при обнаружении 22q11.2DS у плода не имелось типичных для этого синдрома УЗ-признаков, имелось лишь анэхогенное образование в области шеи (лимфодема шейного отдела). Наш предыдущий опыт показал, что для поиска 22q11.2DS у плодов, кроме изолированного увеличения ВП, следует обращать внимание и на лимфатические образования в области шеи, пороки сердечно-сосудистой системы и лицевые дисморфии, пороки внутренних органов [2]. Учитывая клинический полиморфизм этой группы синдромов, который варьирует от почти бессимптомного течения до тяжелых пороков развития и умственной отсталости, актуальным представляется опубликование всех выявленных случаев и расширение поиска необычных УЗ-критериев для пренатальной диагностики такого частого синдрома, как 22q11.2DS [3]. Ранняя, в том числе пренатальная диагностика МД22q11.2 очень важна, т.к. носители этой делеции в постнатальном периоде имеют повышенный риск не только ВПС и ССС, но и по развитию гипокальциемии, иммунодефицитных состояний, аспирационного синдрома и др.

Важной цитогенетической задачей является идентификация состава и наличия эухроматина в мСМХ. В случае формирования маркерных хромосом из гетерохроматина прицентромерных районов акроцентрических хромосом, например при inv dup (15p), как правило, клинического проявления не наблюдается. При наличии в мСМХ эухроматиновых сегментов большое значение имеет не только установление происхождения маркерной хромосомы, но и локализация точек разрывов, возникших при их образова-

нии. Различие мСМХ по составу входящих в них эухроматиновых районов определяет их различное клиническое проявление. В нашем наблюдении № 5 две мСМХ у плода были идентифицированы как производные 5 и 20 хромосом и содержали дублицированные эухроматиновые регионы этих хромосом значительной протяженности, что проявилось в виде выраженной ВЗРП.

В любом случае при обнаружении структурных ХА у плода следует определить кариотипы родителей, чтобы установить спорадический или семейный характер перестройки.

Материала, полученного в ходе инвазивного вмешательства, обычно бывает достаточно для диагностики крупных структурных или числовых ХА, но из-за ограниченности объема исследуемого материала трудно осуществить расширенную молекулярную диагностику. Выбор дополнительного метода лабораторного исследования плодного материала в значительной степени зависит от результатов эхографии, когда по результатам УЗИ можно заподозрить наличие у плода ХА или даже микроперестройки. Тогда, кроме стандартного цитогенетического исследования GTG-методом, следует предусмотреть соответствующее расширенное молекулярно-цитогенетическое исследование плодного материала.

В недавно опубликованном анализе регистра из 11 стран Европы (EUROCAT) по частоте редких хромосомных aberrаций, выявленных пренатально, в первый год жизни или у внутриутробно погибших плодов, определено, что они составили не менее 17% от всех диагностированных ХА. В число редких ХА авторы включали триплоидии, полные трисомии (кроме 13, 18, 21, X и Y), маркерные хромосомы, несбалансированные транслокации, делеции, дубликации, кольцевые хромосомы. Авторы подчеркивают важность составления регистров и определения частоты и вида врожденной патологии, обусловленной редкими ХА, отмечая, что примерно в половине случаев при редких ХА наблюдались отклонения в развитии, выявленные при УЗИ плода [4, 6].

Литература

1. Комплексное обследование плодов с расширенным воротниковым пространством: первый опыт пренатальной диагностики микроделеционных синдромов 22q11.2 в клинической практике / Козлова Ю. О. [и др.] // Пренатальная диагностика. — 2011. — Т. 10, № 1. — С. 47–55.
2. Пренатальная диагностика микроделеции 22q11.2 / Козлова Ю. О. [и др.] // Пренатальная диагностика. — 2012. — Т. 11, № 4. — С. 311–315.
3. Can we predict 22q11 status of fetus with tetralogy of Fallot? / Boudjemline Y. [et al.] // Prenat. Diagn. — 2002. — Vol. 22. — P. 231–234.

4. Prenatal detection of rare chromosomal autosomal abnormalities in Europe / Baena N. [et al.] // Amer. J. Med. Genet. — 2003. — Vol. 118A. — P. 319–327.
5. Prenatal detection of rare chromosomal autosomal abnormalities in Europe / Bretelle F. [et al.] // Eur. J. Med. Genet. — 2010. — Vol. 53. — P. 367–370.
6. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe / Wellesley D. [et al.] // European Journal of Human Genetics — 2012. — Vol. 20, N 5. — P. 521–526.
7. Simpson L., Malone F., Bianchi D. Nuchal translucency and the risk of congenital heart disease // Obstet. Gynecol. — 2007. — Vol. 109, N 2. — P. 376–383.
8. Westin M., Saltvedt S., Bergman G. Increased nuchal translucency thickness a useful screening tool for heart defects? A study of 16,383 fetuses // Ultrasound Obstet. Gynecol. — 2006. — Vol. 27, N 6. — P. 1330–1335.

Статья представлена В. С. Барановым,
ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН,
Санкт-Петербург

RANGE OF THE RARE CHROMOSOMAL ABNORMALITIES DIAGNOSED PRENATALLY AT FETUSES WITH INCREASED NUCHAL TRANSLUCENCY

Zolotukhina T. V., Yudina Ye. V., Shilova N. V.,
Minzhenkova M. E., Kozlova Yu. O., Markova Zh. G.

■ **Summary:** The data provided are given as an illustration of molecular-cytogenetic approach for improvement of prenatal cytogenetic diagnosis of rare chromosomal abnormalities. The main indication for prenatal karyotyping discussed herein presented with increased nuchal translucency at 10–14 weeks of gestation. The following rare chromosomal abnormalities were revealed by FISH: microdeletion 22q11.2, r(13)(p11q22), dup(8)(p23p12), del(13)(q34), invdupY(q10), two sSNMCs of 5 and 20 chromosomes origin. The importance of improving and systematizing of the ultrasonographic diagnosis of “mild” developmental defects, providing of the expanded prenatal molecular studies and contemporary FISH-technique application is emphasized.

■ **Key words:** increased nuchal translucency; prenatal diagnosis; rare chromosomal abnormalities.

■ Адреса авторов для переписки

Золотухина Татьяна Владимировна — зав. лаб. пренатальной диагностики, ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН. 115478, Россия, Москва, Москворечье ул., д. 1. **E-mail:** ztv@med-gen.ru.

Юдина Елена Владимировна — врач ультразвуковой диагностики лаборатории пренатальной диагностики, ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН. 115478, Россия, Москва, Москворечье ул., д. 1. **E-mail:** ztv@med-gen.ru.

Шилова Надежда Владимировна — ведущий научный сотрудник лаборатории пренатальной диагностики, ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН. 115478, Россия, Москва, Москворечье ул., д. 1. **E-mail:** ztv@med-gen.ru.

Миньженкова Марина Евгеньевна — научный сотрудник лаборатории пренатальной диагностики, ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН. 115478, Россия, Москва, Москворечье ул., д. 1. **E-mail:** ztv@med-gen.ru.

Козлова Юлия Олеговна — научный сотрудник лаборатории пренатальной диагностики. ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН. 115478, Россия, Москва, Москворечье ул., д. 1. **E-mail:** ztv@med-gen.ru.

Маркова Жанна Геннадиевна — старший научный сотрудник лаборатории пренатальной диагностики. ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН. 115478, Россия, Москва, Москворечье ул., д. 1. **E-mail:** ztv@med-gen.ru.

Zolotukhina Tatyana Vladimirovna — Head of lab. of prenatal diagnosis, Research Centre for Medical Genetics. 115478, Moscow, Mosk-vorechye St., 1, Russia. **E-mail:** ztv@med-gen.ru.

Yudina Yelena Vladimirovna — Physician of ultrasound diagnosis, Laboratory of Prenatal diagnosis, Research Centre for Medical Genetics. 115478, Moscow, Mosk-vorechye St., 1, Russia. **E-mail:** ztv@med-gen.ru.

Shilova Nadezhda Vladimirovna — Scientific researcher, Laboratory of Prenatal diagnosis, Research Centre for Medical Genetics. 115478, Moscow, Mosk-vorechye St., 1, Russia. **E-mail:** ztv@med-gen.ru.

Minzhenkova Marina Yevgenyevna — Scientific researcher, Laboratory of Prenatal diagnosis, Research Centre for Medical Genetics. 115478, Moscow, Mosk-vorechye St., 1, Russia. **E-mail:** ztv@med-gen.ru.

Kozlova Yuliya Olegovna — Scientific researcher, Laboratory of Prenatal diagnosis Research Centre for Medical Genetics. 115478, Moscow, Mosk-vorechye St., 1, Russia. **E-mail:** ztv@med-gen.ru.

Markova Zhanna Gennadiyevna — Scientific researcher, Laboratory of Prenatal diagnosis, Research Centre for Medical Genetics. 115478, Moscow, Mosk-vorechye St., 1, Russia. **E-mail:** ztv@med-gen.ru.