

Кудрявцева Е.В.¹, Ковалев В.В.¹, Канивец И.В.², Киевская Ю.К.², Коростелев С.А.³

Использование хромосомного микроматричного анализа в пренатальной диагностике в России

1 - Уральский государственный медицинский университет, кафедра акушерства и гинекологии ФПК и ПП и педиатрического факультета, г. Екатеринбург; 2 - ООО «Геномед», г. Москва; 3 - ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, г. Москва

Kudryavtseva E.V., Kovalev V.V., Kanivets I.V., Kiyevskaia J.K., Korostelev S.A.

The use of chromosomal micromatric analysis in prenatal diagnosis in Russia

Резюме

В статье представлены результаты использования ХМА при инвазивной пренатальной диагностике в России. В медико-генетическом центре «Геномед», который впервые в России начал использовать данное исследование, за 2013-2017 гг. было проведено 634 пренатальных исследования на различном биологическом материале: в 221 (34,9%) случае материал был получен путем биопсии ворсин хориона, в 381 (60,1%) путем амниоцентеза и 32 (5%) путем кордоцентеза. Различные хромосомные аномалии были выявлены в 19,7% случаев, описана структура выявленных хромосомных перестроек, продемонстрирована высокая результативность молекулярного кариотипирования. Результаты, полученные при использовании ХМА в России, соответствуют мировому опыту.

Ключевые слова: хромосомный микроматричный анализ, кариотип, пренатальная диагностика, амниоцентез, кордоцентез, синдром Дауна

Summary

The article presents the results of the use of CMA in invasive prenatal diagnostics in Russia. In the Genomed Medical Genetic Center, which for the first time in Russia started using this study, 634 prenatal studies on various biological materials were carried out in 2013-2017: in 221 cases (34.9%), the material was obtained by chorionic villus biopsy, in 381 (60.1%) by amniocentesis and 32 (5%) by cordocentesis. Various chromosomal abnormalities were detected in 19.7% of cases, the structure of the revealed chromosomal rearrangements was described, and the high efficiency of molecular karyotyping was demonstrated. The results obtained with the use of CMA in Russia correspond to the world experience.

Key words: chromosome microarray analysis, karyotype, prenatal diagnostics, amniocentesis, cordocentesis, Down syndrome

Введение

Хромосомный микроматричный анализ (ХМА) – молекулярно-цитогенетический метод анализа вариаций числа копий ДНК по сравнению с набором проб или маркеров, покрывающих определенный набор генов или весь геном, без необходимости культивирования клеток. Хромосомный микроматричный анализ (молекулярное кариотипирование) имеет более высокое разрешение по сравнению со стандартным цитогенетическим исследованием (кариотипированием) – некоторые матрицы могут выявлять делеции и дупликации (вариации числа копий – CNV) размером от 50-100 кб, тогда как при кариотипировании выявляются лишь аномалии размером более 8-10 МБ. Высокое разрешение – это ведущее преимущество ХМА, поскольку не выявленные при кариотипировании микроделеции и микродупликации могут быть причиной широкого спектра генетически детерминированных

заболеваний, в том числе сопровождающихся пороками развития, неврологической патологией и умственной отсталостью [1].

Мировой опыт, накопленный в течение последнего десятилетия, показал, что ХМА может быть ценным инструментом при пренатальной диагностике хромосомной патологии плода. Этот метод демонстрирует лучшее выявление хромосомных аномалий, чем цитогенетическое исследование [1,2].

Сравнительная оценка ХМА и анализа кариотипа при пренатальной диагностике была проведена в нескольких крупномасштабных исследованиях. Особенно полезным использование ХМА оказалось при наличии пороков развития плода, выявленных с помощью УЗИ. В 2012 году мультицентровое исследование, организованное Национальным Институтом Здоровья Ребенка и Человеческого Развития (NICHD), показало, что при беременно-

стях с установленными ультразвуковыми аномалиями и нормальным кариотипом у плода, в 6% случаев при проведении ХМА были обнаружены клинически значимые CNVs (делеции и дупликации), а при отсутствии ультразвуковых маркеров хромосомных аномалий структурные перестройки хромосом были выявлены у 1,7% плодов из тех, чей кариотип был в норме [2]. В клинических рекомендациях Американской Коллегии Акушеров-Гинекологов (ACOG) и Общества Медицины Матери и Плода (SMFM) отмечается необходимость использования ХМА в качестве теста первой линии в случаях, выявления по результатам УЗИ пороков развития плода, проведение традиционного анализа кариотипа при этом не требуется (уровень доказательности 1А). У плода с нормальным анатомическим строением возможно использование как ХМА, так и анализ кариотипа [3].

Другим важным преимуществом ХМА является то, что в процессе постановки методики анализа исключается этап культивирования клеток, который необходим при постановке цитогенетического анализа. Это различие способствует более быстрому получению результата. При пренатальной диагностике сроки проведения анализа особенно важны, поскольку результат может существенно повлиять на тактику ведения беременности. Кроме этого, исключается фактор неудачного культивирования, полученного биологического материала, что повышает эффективность исследования.

ХМА может быть выполнен на любом доступном биологическом материале полученном как при аспирации ворсин хориона, так и при амниоцентезе, либо кордоцентезе.

Несмотря на высокую результативность ХМА, необходимо информировать пациентов о том, что данный метод имеет некоторые ограничения. ХМА не выявляет точковые мутации в генах (однонуклеотидные полиморфизмы), изменение числа тринуклеотидных повторов. Поскольку ХМА определяет только несбалансированные хромосомные аномалии, использовать его для поиска сбалансированных перестроек нельзя. Помимо этого, может быть не выявлен низкий уровень хромосомного мозаицизма [1].

Следует также предупредить пациента о возможности получения результата с неопределенной клинической значимостью. Распространенность вариантов с неопределенной клинической значимостью составляет 1-2%. При подобных CNVs могут быть различные исходы, невозможно точно предсказать постнатальный фенотип. Однако дополнительная информация по классификации CNVs быстро накапливается (в связи с увеличением числа проведенных исследований в мире), и с течением времени количество случаев с неопределенным клиническим значением уменьшается. Пациенты, чей плод является носителем перестройки с неопределенным клиническим значением, должны быть проконсультированы экспертами, имеющими доступ к базам данных, которые предоставляют обновляемую информацию о корреляциях между генотипом и фенотипом. В некоторых случаях полезным может быть обследование родителей на носительство вы-

явленной перестройки – CNVs, появившиеся de novo являются патогенными чаще [1,4].

Для того, чтобы снизить вероятность пренатального выявления CNVs с неопределенным клиническим значением, некоторые специалисты рекомендуют использовать при проведении ХМА матрицы с более низким разрешением. Но в этом случае необходимо учитывать, что в постнатальном периоде может появиться новая клиническая информация, и при использовании матриц более высокого разрешения могут быть выявлены ранее не определенные CNV [4]. Может быть уточнена и клиническая значимость ранее выявленных CNVs с неизвестной клинической значимостью.

В России ХМА используется в пренатальной диагностике с 2013 года. Впервые в нашей стране данная методика была поставлена в медико-генетическом центре «Геномед», г. Москва. Благодаря возможности транспортировки (материал может быть доставлен в лабораторию в течение 48ч) в настоящее время возможно направить биологический материал, полученный при инвазивной пренатальной диагностике, из любого региона России для проведения ХМА.

Целью нашей работы было оценить результаты использования ХМА при пренатальной диагностике в России.

Материалы и методы

Были проанализированы образцы, направленные для проведения ХМА с целью пренатальной диагностики хромосомной патологии плода в медико-генетическом центре «Геномед».

При проведении ХМА использовались SNP-олигонуклеотидные микроматрицы Cytoscan Optima (Thermo Fisher, США). С помощью данного типа матриц, помимо определения CNVs, возможно определение полиплоидии и однородительской дисомии (в отличие от сравнительной геномной гибридизации, при которой определяются только вариации числа копий). Выделение и анализ ДНК проводились в соответствии с протоколом производителя реагентов. Определение вариаций числа копий (CNVs) производилось путем измерения интенсивности сигнала с зондов.

Результаты и обсуждение

В период с марта 2013 по октябрь 2017 года в центре «Геномед» было проведено 634 пренатальных исследования методом ХМА.

В 221 (34,9%) случае материал был получен путем биопсии ворсин хориона, в 381 (60,1%) путем амниоцентеза и 32 (5%) путем кордоцентеза.

Динамика количества исследований за 2013-2017 гг. представлена на рис. 1. Методика начала внедряться в 2013 году, и уже в 2014 году наблюдается резкий рост количества анализов. В 2015 году количество анализов, проведенных в центре «Геномед» несколько снизилось, возможно, за счет того, что оборудование, необходимое для проведения ХМА появилось и в других центрах, произошло перераспределение потока пациентов, чей

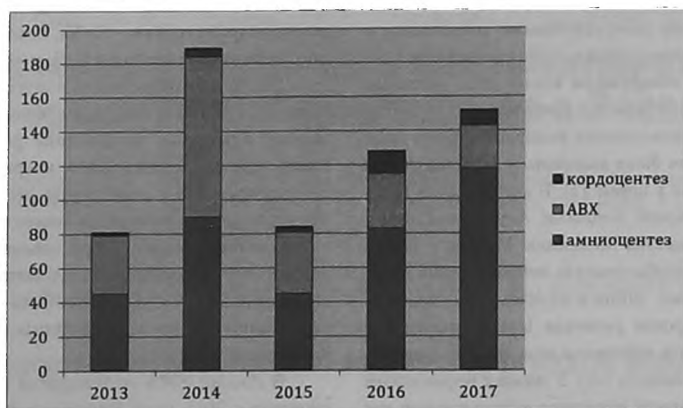


Рис. 1. Количество образцов, полученных при инвазивной диагностике с помощью различных методов забора плодного материала.

Таблица 1. Результаты пренатального ХМА

Тип CNV	Количество образцов, абс.	% среди всех образцов (N=634)	% среди выявленных хромосомных перестроек (N=125)
Аутосомные трисомии	44	6,9	35,2
Мозаичные аутосомные трисомии	7	1,1	5,6
Трисомии/моносомии целого плеча хромосомы	5	0,8	4
Анеуплоидии гоносом	5	0,8	4
Триплоидия	2	0,3	1,6
Микроделеционные/микродупликационные синдромы	12	1,9	9,6
Патогенные делеции/дупликации не классифицированные как синдром	8	1,3	6,4
Дисбаланс двух и более негомологичных хромосом	8	1,3	6,4
Множественные аномалии одной хромосомы	8	1,3	6,4
Патогенные CNV, захватывающие гены, связанные с моногенными заболеваниями	4	0,6	3,2
Протяженные участки отсутствия гетерозиготности	8	1,3	6,4
CNV с неопределенным клиническим значением	10	1,6	8
Неклассифицированный дисбаланс	4	0,6	3,2
Контаминация материнскими клетками	2	0,3	-
Норма	507	80	-

материал после инвазивной диагностики направлялся на данный анализ. Тем не менее с 2015 года наблюдается стойкий рост количества анализов, что свидетельствует о неуклонном росте интереса к данной методике и пониманию врачами ее диагностических возможностей.

Различные хромосомные аномалии были выявлены в 125 случаях (19,7%). В 507 случаях (80%) был получен нормальный молекулярный кариотип. Такое большое количество выявленных хромосомных аномалий объясняется, во-первых, более высокой результативностью ХМА по сравнению с традиционным анализом кариотипа, а, во-вторых, тем, что большая часть образцов направлялась на анализ во втором триместре беременности при наличии веских оснований для проведения инвазивной диагностики, например, при выявлении пороков развития у плода. У некоторых пациенток, которым был про-

веден амниоцентез или кордоцентез, уже проводилась инвазивная диагностика в первом триместре, материал направлялся на цитогенетическое исследование и был получен нормальный результат. При этом во втором триместре выявлялись ультразвуковые аномалии по УЗИ и предлагалось провести инвазивную диагностику повторно, с помощью более точного метода исследования.

В 2 случаях (0,3%) анализ провести не удалось из-за контаминации материнскими клетками.

Структура выявленных хромосомных перестроек представлена в таблице 1.

Среди аутосомных трисомий чаще всего встречалась трисомия 21 (синдром Дауна) – 34 случая. Также в этой группе перестроек выявлялись трисомия 13 (синдром Патау) – 5 случаев, трисомия 18 (синдром Эдвардса) – 4 случая и трисомия 9. В мозаичном варианте встреча-

лись те же самые синдромы (по 1 случаю), а также трисомия 20 (1 случай) и трисомия одновременно двух аутосом (1 случай). В 5 случаях были определены моносомии и трисомии целых плеч аутосом, в 2 случаях – триплоидия.

Среди анеуплоидий половых хромосом было выявлено 3 случая моносомии X (синдром Тернера) и 2 – полисомии X-хромосомы у плода мужского пола (синдром Клайнфельтера), причем в одном случае был выявлен мозаичный вариант данного синдрома.

При проведении ХМА в исследуемой группе было выявлено 12 случаев микроделеционных и микродупликационных синдромов, среди которых синдром делеции 22q11.2 (синдром Ди-Джорджи), делеция 22q13 (синдром Фелана-Макдермида), делеция 8p23.1, делеция 15q11.2, делеция 16q22 и микродупликации 16p13.11. Данные синдромы описаны в литературе и зарегистрированы в различных базах данных, в том числе в базе OMIM. Помимо этого, было выявлено 5 делеций и 3 дупликации, расцененных как патогенные, но не описанные как клинический синдром. Также было выявлено 8 случаев структурного дисбаланса двух или более хромосом и 8 случаев множественного дисбаланса внутри одной хромосомы. Подобные перестройки не исключают несбалансированной транслокации, которая может иметь наследственный характер и быть результатом наличия сбалансированной реципрокной транслокации или инверсии у одного из родителей. Большинство из этих CNVs не было бы выявлено при проведении стандартного цитогенетического исследования.

Интересными находками являются CNVs небольшого размера, но захватывающие гены, связанные с моногенными заболеваниями, в том числе и доминантные заболевания с поздним началом. Эти CNV могут быть унаследованы от родителей, которых необходимо предупредить о такой возможности при претестовом консультировании. Среди пациенток центра «Геномед» при пренатальной диагностике было выявлено 4 таких случая: делеция генов, связанных с развитием анемии Фалькони, бокового амиотрофического склероза, спастической параплегии и эктодермальной дисплазии.

При проведении молекулярного кариотипирования с использованием SNP-матриц, возможно выявление протяженных участков отсутствия гетерозиготности (LCSH). Существенного клинического значения данный результат

при пренатальной диагностике не имеет, но тем не менее указывается в заключении. Мы получили такой результат 8 раз. Следует учитывать, что при наличии протяженных участков отсутствия гетерозиготности повышается риск аутосомно-рецессивных заболеваний.

CNV с неопределенным клиническим значением были выявлены в 10 случаях (1,5% среди всех полученных образцов, что соответствует данным литературы [1]).

Всем пациенткам, у которых были выявлены какие-либо особенности по результатам ХМА, была рекомендована консультация генетика.

Выводы

1. Хромосомный микроматричный анализ может использоваться при инвазивной пренатальной диагностике в качестве теста первой линии.

2. При направлении на инвазивную пренатальную диагностику пациенты должны быть информированы о возможностях и ограничениях ХМА и цитогенетического исследования.

3. Перед проведением ХМА пациенту должно быть проведено обязательное претестовое консультирование, на котором следует сообщить о том, что не все результаты ХМА имеют однозначную интерпретацию и о том, что может потребоваться обследование не только плода, но и его родителей.

4. Результаты, полученные при использовании ХМА в России соответствуют мировому опыту.

5. Количество анализов, выполненных методом молекулярного кариотипирования в России неуклонно растет, в связи с чем требуется подготовка специалистов, способных грамотно провести претестовое и послетестовое консультирование пациента. ■

к.м.н. Кудряцева Е.В., проф. Ковалев В.В., Уральский государственный медицинский университет, кафедра акушерства и гинекологии ФПК и ПП и педиатрического факультета, г. Екатеринбург; к.м.н. Канивец И.В., Киевская Ю.К., ООО «Геномед», г. Москва проф. Коростелев С.А., ФГАОВУ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), г. Москва; Автор, ответственный за переписку - Кудряцева Елена Владимировна, 620109, Екатеринбург, ул. Токарей 27/2-87, elenavlada@yandex.ru

Литература:

1. Dugoff L., Norton M.E., Kuller J.A. The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2016 Oct;215(4):B2-9.
2. Callaway J.L., Shaffer L.G., Chitty L.S., Rosenfeld J.A., Crolla J.A. The clinical utility of microarray technologies applied to prenatal cytogenetics in the presence of a normal conventional karyotype: a review of the literature. *Prenat Diagn* 2013; 33:1119-23.
3. Prenatal diagnostic testing for genetic disorders. *Practice Bulletin No. 162. American College of Obstetricians and Gynecologists.* *Obstet Gynecol* 2016;127:e108-22.
4. Hui L., Bianchi D.W. Recent advances in the prenatal interrogation of the human fetal genome. *Trends Genet* 2013;29:84-91.