

**ПРЕНАТАЛЬНАЯ
ДИАГНОСТИКА
НАСЛЕДСТВЕННЫХ
И ВРОЖДЕННЫХ
БОЛЕЗНЕЙ**

Под ред. Э.К.Айламазяна,
В.С.Баранова

ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ И ВРОЖДЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

*Под редакцией
академика РАМН,
профессора **Э.К.Айламазяна**,
члена-корреспондента РАМН,
профессора **В.С.Баранова***

Второе издание



Москва
«МЕДпресс-информ»
2007

УДК 618.2-079.7

ББК 57.16

П71

Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в любой форме и любыми средствами без письменного разрешения владельцев авторских прав.

Авторы и издательство приложили все усилия, чтобы обеспечить точность приведенных в данной книге показаний, побочных реакций, рекомендуемых доз лекарств. Однако эти сведения могут изменяться.

Внимательно изучайте сопроводительные инструкции изготовителя по применению лекарственных средств.

Пренатальная диагностика наследственных и врожденных болезней / Под ред. акад. РАМН, проф. Э.К.Айламазяна, чл.-корр. РАМН, проф. В.С.Баранова. — 2-е изд. — М. : МЕДпресс-информ, 2007. — 416 с. : ил.

ISBN 5-98322-345-3

Монография подготовлена коллективом авторов, создавших и многие годы обеспечивающих службу пренатальной диагностики наследственных и врожденных болезней в таком мегаполисе, как Санкт-Петербург. Их богатый практический опыт, многочисленные оригинальные разработки по молекулярной и цитогенетической диагностике, алгоритмы пренатальной диагностики генных и хромосомных болезней на разных сроках беременности суммированы в данном издании.

Данное издание предназначено для врачей акушеров-гинекологов, специалистов по медицинской генетике, организаторов здравоохранения в области охраны здоровья матери и ребенка. Оно может служить учебным пособием для студентов медицинских вузов, биологических и медицинских факультетов университетов при изучении проблем этиологии, патогенеза и профилактики наследственных и врожденных болезней человека.

УДК 618.2-079.7

ББК 57.16

ISBN 5-98322-345-3

© Оформление, оригинал-макет.

Издательство «МЕДпресс-информ», 2006

Основателю
Императорского Повивального института —
ныне НИИ акушерства и гинекологии
им. Д.О.Отта РАМН —
Дмитрию Оскаровичу Отту
ПОСВЯЩАЕТСЯ

akusher-lib.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|-----|
| Предисловие. <i>Е.К. Гинтер</i> | 6 |
| Введение. <i>В.С. Баранов, Э.К. Айламазян</i> | 8 |
| Глава I. Предмет и задачи пренатальной диагностики. <i>В.С. Баранов</i> | 13 |
| Глава II. Основы проэмбрионального и эмбрионального развития человека. <i>В.С. Баранов</i> | 25 |
| Глава III. Методы оценки состояния плода. <i>В.С. Баранов, Т.В. Кузнецова</i> | 64 |
| Глава IV. Основы тератологии человека. Тератологическое консультирование. <i>В.С. Баранов, В.Г. Вахарловский</i> .. | 74 |
| Глава V. Особенности медико-генетического консультирования при беременности. <i>В.Г. Вахарловский, М.В. Кречмар, В.С. Баранов</i> | 93 |
| Глава VI. Скринирующие программы в пренатальной диагностике. <i>В.С. Баранов, Т.В. Кузнецова</i> | 116 |
| Глава VII. Биохимический скрининг маркерных белков при беременности. <i>Т.К. Кашеева</i> | 125 |
| Глава VIII. Ультразвуковой скрининг. <i>Е.С. Некрасова</i> | 172 |
| Глава IX. Инвазивные методы пренатальной диагностики. <i>А.Л. Коротеев</i> | 193 |
| Глава X. Пренатальная диагностика хромосомных болезней. <i>Т.В. Кузнецова, О.Г. Чиряева</i> | 217 |
| Глава XI. Пренатальная диагностика генных болезней. <i>Т.Э. Иващенко</i> | 280 |
| Глава XII. Организационные проблемы пренатальной диагностики. <i>А.Л. Коротеев</i> | 312 |
| Глава XIII. Проблема этики в пренатальной диагностике. <i>М.В. Кречмар</i> | 344 |
| Глава XIV. Новые направления в пренатальной диагностике. <i>В.С. Баранов</i> | 355 |
| Глава XV. Горизонты пренатальной диагностики. <i>В.С. Баранов</i> | 367 |
| Заключение. <i>В.С. Баранов</i> | 379 |
| Литература | 385 |

ПРЕДИСЛОВИЕ

Пренатальная диагностика наследственных заболеваний и изолированных врожденных пороков развития стала мощным инструментом современной медицины, позволяющим существенно снизить перинатальные потери и уменьшить число больных с тяжелыми инвалидизирующими заболеваниями. Однако такой результат достигается только в том случае, когда существует четко организованная служба пренатальной диагностики, в которой объединяются усилия медицинских генетиков, акушеров-гинекологов, специалистов по биохимической и цитогенетической лабораторной диагностике и других специалистов. Именно такая «команда» сложилась на базе лаборатории пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний Санкт-Петербургского НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта, организованной в 1987 году. Здесь впервые в нашей стране были апробированы различные методы пренатальной диагностики ряда моногенных наследственных заболеваний, и здесь же прошли подготовку по пренатальной диагностике многие специалисты из институтов и клиник Москвы, Уфы, Томска и других городов России. Уникальный опыт в организации службы пренатальной диагностики, накопленный за почти 20 лет работы, проанализированный и хорошо осмысленный, лег в основу многочисленных методических рекомендаций, глав в различных отечественных руководствах, а сейчас — в написании коллективной монографии.

Монография включает введение, 15 глав, посвященных не только собственно предмету пренатальной диагностики, но и основам эмбрионального развития, методам оценки состояния плода, основам тератологии человека, т.е. того базиса, на котором и строится пренатальная диагностика. В книге нашло четкое обоснование медико-генетическое консультиро-

вание как объединяющее начало всей пренатальной диагностики. Это абсолютно правильный подход и с точки зрения гуманистических принципов и с сугубо практической точки зрения, так как пренатальная диагностика в каждой семье важна не только сама по себе, но и как подход для определения врачом-генетиком и семьей ее дальнейшего репродуктивного поведения. В книге есть даже специальная глава (и это следует всячески приветствовать), посвященная проблемам этики в пренатальной диагностике. Все главы написаны известными специалистами в разных проблемах пренатальной диагностики.

В целом, как мы полагаем, это очень хорошее руководство по пренатальной диагностике различных врожденных состояний, в том числе наследственных болезней. Кроме того, в нем содержится критический анализ состояния службы пренатальной диагностики в стране, который должен помочь всем, кто занимается пренатальной диагностикой, но особенно — организаторам здравоохранения, исправить те ошибки, которые еще нередко случаются в организации этой службы.

Академик РАМН, профессор Е.К. Гинтер

по отдельным направлениям ПД (Медведев М.В., Юдина Е.А., 2003; Бахарев В.А., 2004).

Лаборатория пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта РАМН (Санкт-Петербург), основанная в 1987 г., является одним из 7 федеральных медико-генетических центров России, единственным федеральным центром ПД муковисцидоза (самого частого моногенного наследственного заболевания) и совместно с Диагностическим центром (медико-генетическим) обеспечивает службу пренатальной диагностики не только в Санкт-Петербурге, но и во всем Северо-Западном регионе России. За 18 лет существования лаборатории выполнено свыше 8000 инвазивных процедур по забору плодного материала, предотвращено рождение более 500 плодов с тяжелыми хромосомными и генными болезнями, т.е. больше, чем в любом известном нам центре ПД РФ. В лаборатории накоплен уникальный методический, клинический и организационный опыт ПД. В частности, разработаны оригинальные методы цитогенетического анализа с целью кариотипирования плода, предложены собственные, адаптированные к популяционно-генетическим особенностям региона алгоритмы ПД тяжелых, социально значимых наследственных заболеваний, таких как муковисцидоз, фенилкетонурия, гемофилия, миодистрофия Дюшенна и др., отлажены оптимальные алгоритмы взаимодействия всех уровней службы ПД в таком мегаполисе, каким является Санкт-Петербург. Сотни врачей медико-генетических консультаций и центров ПД РФ прошли обучение на рабочих местах или получили консультации, сотни студентов и слушателей Военно-медицинской академии и медицинского факультета СПбГУ прослушали курсы лекций сотрудников лаборатории по ПД.

Практические наработки лаборатории по отдельным направлениям и методам исследования уже были обобщены в серии обзоров, методических рекомендаций и глав в монографиях (Айламазян Э.К., Баранов В.С., 2002; Баранов В.С., 2003; Баранов В.С. и др., 2002, 2004).

На данном этапе научно-практической деятельности лаборатории, с учетом явного дефицита информации в отечественной литературе о современных возможностях ПД и ее перспективах, нам представляется актуальным обобщить много-

летний опыт лаборатории в области ПД хромосомных и генных болезней, рассмотреть современные диагностические возможности и существующие алгоритмы ПД.

В монографии суммируются данные о частоте ВНЗ в РФ, дается определение ПД как науки (в отличие от понимания ее клиницистами как набора различных методов для оценки состояния плода), рассматриваются цели и задачи ПД (см. главу I). Глава II целиком посвящена основам проэмбрионального и эмбрионального развития человека, столь существенным для понимания генеза аномалий и их лабораторной диагностики. Обзору современных методов оценки состояния плода и отбору женщин групп высокого риска ВНЗ посвящена глава III. Обобщенные представления о неблагоприятном действии внешних факторов на эмбриогенез человека (тератология) представлены в главе IV. Проблемы медико-генетического консультирования при физиологической беременности и при беременности, наступившей в результате экстракорпорального оплодотворения, рассмотрены в главе V. Общие представления о скринирующих программах, используемых в ПД, приведены в главе VI. Основные положения биохимического скрининга в I и II триместрах беременности – в главе VII. Проблемы ультразвукового скрининга и некоторые особенности инвазивных методов забора плодного материала на разных сроках беременности рассмотрены в главах VIII и IX. В качестве крупных самостоятельных разделов монографии выступают ПД хромосомных (см. главу X) и частых моногенных болезней (см. главу XI). Клинические и организационные аспекты ПД обсуждаются в главе XII. Специальная глава посвящена такой сложной проблеме ПД, как проблема этики медико-генетического консультирования (см. главу XIII). Заключительные главы монографии (см. главы XIV и XV, соответственно) представляют собой обзор современных, уже применяемых в ведущих лабораториях мира и новых, разрабатываемых методов ПД, а также перспектив развития этого многообещающего научно-практического направления медицинской генетики в обозримом будущем.

Предлагаемая монография должна помочь акушерам-гинекологам родовспомогательных учреждений, специалистам по медицинской генетике, организаторам здравоохранения в более полном использовании уже имеющихся возможнос-

тей и повышении эффективности ПД с целью профилактики наследственной и врожденной патологии у детей. Монография может служить учебным пособием для студентов медицинских вузов, биологических и медицинских факультетов университетов по проблеме этиологии, патогенеза и профилактики наследственных и врожденных пороков развития у человека.

akusher-lib.ru

ГЛАВА I. ПРЕДМЕТ И ЗАДАЧИ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Пренатальная диагностика (ПД) как новое научно-практическое направление медицинской генетики возникла в 70-х годах прошлого века на стыке клинических (акушерство, гинекология, перинатология, неонатология) и фундаментальных наук (генетика, цитогенетика, молекулярная биология, эмбриология, биохимия). *Клинические задачи ПД включают изучение состояния плода и матери, определение оптимальных сроков и техники получения плодного материала, тактику ведения беременности и родов после инвазивной ПД*, т.е. после исследования плодного материала специальными методами лабораторной генетики. Таким образом, *основу ПД составляют ранняя диагностика и предупреждение рождения детей с тяжелыми некорректируемыми врожденными и наследственными заболеваниями (ВНЗ)*.

Согласно рекомендациям ВОЗ и Европейской ассоциации перинатальной медицины под ПД понимается «совокупность всех методов диагностики состояния плода, которая направлена на дородовое выявление врожденных дефектов, представляющих собой любые аномалии в морфологическом, структурном, функциональном или молекулярном развитии, диагностируемые при рождении (или манифестирующие позже), наружные или внутренние, наследственные или спорадические, единичные или множественные» (Cartera J.M., Di Renzo G.C., 1993).

Важно отметить, что проблема профилактики ВНЗ отнюдь не исчерпывается только ПД. В современной медицине, точнее в медицинской генетике, разделом которой является и ПД, система профилактики ВНЗ реализуется на трех основных уровнях (Бочков Н.П., 2004).

Профилактика 1-го уровня (типа) — это комплекс мероприятий, осуществляемых еще до зачатия. Их назначение — предотвратить появление ВНЗ, т.е. обеспечить оптимальные усло-

вия для развития половых клеток, оплодотворения и начальных этапов эмбриогенеза. Она включает *медико-генетическое консультирование* для оценки риска наследственной патологии, *тератологическое консультирование* с целью минимизации возможного неблагоприятного действия повреждающих внешних факторов, в том числе лекарственных препаратов, до зачатия и во время беременности, *преконцепционную профилактику*, основанную на дието- и витаминотерапии (профилактическое применение витаминов и больших доз фолиевой кислоты), своевременное *лечение некоторых хронических заболеваний женщины* (диабет, тиреотоксикоз и др.). Она также включает определение Rh-принадлежности супругов и при необходимости – вакцинацию против краснухи. Наиболее полно этот тип профилактики должен осуществляться в центрах планирования семьи, в женских консультациях и в медико-генетических кабинетах и центрах.

Профилактика 2-го типа направлена на раннюю диагностику и предупреждение рождения детей с тяжелыми инвалидизирующими и не поддающимися лечению ВНЗ. Ее основной составляющей как раз и является ПД. Отчасти к этому типу профилактики относятся и различные варианты лечения плода (медикаментозная терапия, заменные переливания крови при гемолитической анемии плода, обусловленной его резус-конфликтом с матерью, некоторые типы оперативных вмешательств, число которых постепенно увеличивается).

Профилактика 3-го типа касается тактики ведения новорожденных с ВНЗ и направлена на обеспечение не проявления (минимизацию) патологического фенотипа, а также социальную адаптацию ребенка с ВНЗ. Классическим примером такой профилактики является предупреждение развития патологического состояния у детей с фенилкетонурией, которых вскоре после рождения переводят на искусственную диету, лишенную фенилаланина, и тем самым предотвращают токсическое действие фенилаланина на развивающийся мозг ребенка. Конечно, этот вариант лишь достаточно условно можно рассматривать как «профилактику» ВНЗ, которое, увы, уже возникло. Выяснение доли наследственного компонента в этиологии ВНЗ важно для выбора правильной тактики лечения и его профилактики при следующей беременности.

Ответы на эти вопросы могут быть получены только с помощью специальных лабораторных методов исследования,

разработанных фундаментальными науками и широко применяемых в современной ПД.

Таким образом, в практическом плане *ПД представляет собой комплекс врачебных мероприятий и диагностических методов, направленных на выявление морфологических, структурных, функциональных или молекулярных нарушений внутриутробного развития человека. Последние могут проявляться в виде изолированных или множественных врожденных уродств, дисрупций, деформаций, недоразвитий, хромосомных или моногенных болезней, в виде пороков или дисфункций жизненно важных систем, органов и тканей, которые ведут к гибели плода или к тяжелым, нередко смертельным, заболеваниям в постнатальном периоде.*

Практические задачи ПД включают:

- предоставление будущим родителям исчерпывающей информации о степени риска рождения больного ребенка;
- при наличии высокого риска – предоставление информации о возможности прерывания беременности и последствиях принятого родителями решения – родить больного ребенка или прервать беременность;
- обеспечение оптимального ведения беременности и ранней диагностики внутриутробной патологии;
- определение прогноза здоровья будущего потомства.

Решение этих важных практических задач отнюдь не исчерпывает значение ПД для современной науки. Более того, по мнению авторов, понимание ПД исключительно как «набора диагностических методов и приемов для оценки состояния плода», безусловно, обедняет это новое прогрессивное направление медицинской генетики. *Возможность получения плодного материала и его анализ при помощи современных молекулярных, цитологических, биохимических и других методов практически на любой стадии внутриутробного развития позволяют не только установить точный диагноз, но и получить принципиально новую информацию о тонких механизмах эмбрионального развития человека.* Прежде всего, это касается изучения особенностей структурно-функциональной организации генома эмбриональных клеток, реализации наследственной программы развивающегося зародыша человека в норме

и при патологии, разработки на этой основе оптимальных способов профилактики, диагностики, а в обозримом будущем — и лечения наследственных болезней. Вооруженная молекулярными, цитогенетическими, биохимическими и другими точными методами исследования, *ПД сегодня в научном плане — это современная эмбриология и генетика эмбрионального развития человека*. Следовательно, имеются все основания рассматривать ПД не как простой набор диагностических методов и приемов, но как вполне самостоятельное научное направление в изучении фундаментальных проблем биологии развития (эмбриологии) человека.

Таким образом, *ПД на современном этапе обнаруживает двойственную природу. С одной стороны — это практический раздел медицинской генетики, целью которого является диагностика и профилактика ВНЗ, с другой — это генетика эмбрионального развития человека, т.е. раздел фундаментальной науки.*

1.1. КРАТКАЯ ИСТОРИЯ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Всю сравнительно недолгую историю ПД можно подразделить на 4 этапа, каждый из которых отражает появление новых методов:

I этап (1950—1980 гг.) — первые попытки получения материала плода.

II этап (1980—1990 гг.) — внедрение ультразвукового и биохимического скринингов, разработка методов кариотипирования плода.

III этап (1990—2000 гг.) — внедрение молекулярных методов ДНК-диагностики НБ и разработка оптимальных алгоритмов ПД ВНЗ.

IV этап (2000 г. — по наст. вр.) — решение всех основных методических проблем ПД.

1.1.1. Первые попытки получения материала плода

Амниоцентез с целью получения образцов амниотической жидкости (АЖ) с находящимися в ней клетками (КАЖ) впервые был выполнен еще в 30-х годах прошлого века. В 50-х годах предпринимались попытки использовать этот метод для лечения эритробластоза у плода и определения его Rh-принадлежности. В середине 60-х годов было установлено, что часть КАЖ способна к пролиферации и к образованию коло-

ний *in vitro* (Steele M.W., Breg W.R., 1966). Это позволило внедрить методы кариотипирования плода по КАЖ, широко применяемые и в настоящее время. Несколько позднее АЖ, а также КАЖ, стали использовать для биохимической диагностики некоторых заболеваний обмена веществ (Nadler H.L., 1968), а начиная с 90-х годов также и для молекулярной диагностики различных моногенных заболеваний (Баранов В.С. и др., 1997).

В настоящее время в зарубежных странах трансабдоминальный амниоцентез на 15–17 нед. беременности является основным среди других инвазивных методов получения образцов плодного материала с целью кариотипирования плода.

Первые попытки получения образцов хориона в I триместре беременности с применением эндоскопической техники были предприняты в 60–70-е годы XX века и были проведены перед медицинским абортom (Mohr J., 1968). Массовые исследования хориона в целях определения пола плода по половому хроматину были осуществлены в Китае (Anshan department, 1975). Однако значительное число послеоперационных осложнений и проблемы с получением хромосомных препаратов свидетельствовали против применения хорионбиопсии в диагностических целях (Hahnemann N., 1974; Goldberg M.F. et al., 1980).

1.1.2. Внедрение ультразвукового (УЗ) и биохимического скринингов, разработка методов кариотипирования плода

Решающий вклад в становление ПД, в развитие и совершенствование техники получения плодного материала (инвазивных методов) сыграло внедрение в акушерство метода ультрасонографии. Широкое применение и быстрое усовершенствование этой техники, позволяющей визуализировать морфологию плода, изучать в реальном времени его отдельные органы и системы, быстро привело к тому, что данный метод занял ведущее место в ПД ВПР. Внедрение ультразвукового исследования (УЗИ) также способствовало быстрому совершенствованию техники получения плодного материала. Первые успешные попытки хорионбиопсии под контролем УЗИ были осуществлены в нашей стране в лаборатории В.А. Бахарева (Центр охраны здоровья матери и ребенка РАМН) (Розовский В.С. и др., 1980; Kazy Z. et al., 1982). Использованная

авторами трансцервикальная хорионбиопсия с помощью щипцов не нашла, однако, широкого применения и, насколько нам известно, в РФ выполняется только в одном центре (Бахарев В.А., 2004). Более широкое распространение в середине 80-х годов получил метод трансцервикальной аспирации ворсин хориона при помощи гибкого катетера (Brambati V. et al., 1985). Однако наиболее удачной модификацией явилась трансабдоминальная аспирационная биопсия (Brambati V., Oldrini A., 1986). Неоспоримые преимущества этого метода (минимальный перечень противопоказаний, низкая частота послеоперационных осложнений и высокая эффективность получения материала) предопределили повсеместное внедрение этого метода в практику работы медико-генетических центров (МГЦ) за рубежом и в нашей стране. Использование УЗИ в настоящее время позволяет выявлять до 86% всех ВПР. Вместе с тем, важно отметить, что самого по себе УЗИ не достаточно для диагностики наследственных болезней как хромосомной, так и моногенной природы. В лучшем случае они позволяют выявить ВПР и ультразвуковые маркеры, указывающие на высокую вероятность нарушений наследственного аппарата у плода. Благодаря своей высокой эффективности, безопасности для плода и матери, УЗИ получило широкое распространение в качестве прямого неинвазивного скринирующего метода с целью выявления женщин групп высокого риска по рождению детей с ВНЗ (см. главу IX).

В 80-е годы XX века были заложены концептуальные и методические основы биохимического скрининга. Суть его состоит в определении содержания в крови беременных эмбриональных сывороточных белков – продуктов жизнедеятельности эмбриональных клеток. Первым таким маркерным белком оказался α -фетопротеин, продуцируемый клетками печени плода. Содержание этого белка в крови беременной существенно изменяется не только в случае некоторых анатомических пороков (прежде всего, дефектов зарощения нервной трубки), но и при хромосомных болезнях. При патологии кариотипа плода, особенно при болезни Дауна (трисомия 21) изменяется концентрация и такого эмбрионального белка, как хориальный гонадотропин – продукт клеток цитотрофобласта плаценты. В последующие годы были выявлены еще несколько белков, концентрации которых в крови беременной женщины менялись при наличии хромосомных на-

рушений кариотипа плода (неконъюгированный эстриол, ингибин и др.). Были разработаны специальные компьютеризированные системы подсчета риска хромосомных болезней в зависимости от содержания сывороточных маркерных белков в диагностические сроки беременности. Состояние и эффективность различных программ биохимического скрининга подробно рассмотрены в главе VII.

Наконец, решающий вклад в ПД хромосомных болезней был достигнут в этот период благодаря появлению и совершенствованию методов приготовления хромосомных препаратов, позволяющих надежно диагностировать не только численные, но и многие структурные хромосомные aberrации (см. главу X).

1.1.3. Внедрение молекулярных ДНК-методов диагностики НБ и разработка оптимальных алгоритмов ПД ВНЗ

Конец 80-х — начало 90-х годов XX века ознаменовались бурным внедрением в ПД молекулярно-генетических методов и, прежде всего, методов ДНК-диагностики. Быстрый прогресс в изучении генома человека, достигнутый международной программой «Геном человека», идентификация многих тысяч новых генов человека, в том числе генов, мутации которых приводят к наиболее частым, нередко смертельным заболеваниям (миодистрофия Дюшенна, муковисцидоз, гемофилия, фенилкетонурия), появление новых высокоэффективных методов ДНК-диагностики, основанных на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР), способствовали успешному решению проблемы ПД моногенных болезней (см. главу XI). Накопленный к этому времени ведущими центрами опыт ПД позволил разработать и предложить для внедрения оптимальные алгоритмы ПД хромосомных и генных болезней в I и II триместрах беременности (см. главы X и XI).

1.1.4. Основные методические проблемы ПД уже решены

Благодаря существенному усовершенствованию скринирующих программ по выявлению женщин групп высокого риска рождения детей с ВНЗ, безопасности и эффективности инвазивных методов получения плодного материала на любом сроке беременности и, конечно, диагностическим возможностям лабораторной базы, ПД вступила в XXI век с уже

решенными основными проблемами. Это, конечно, не означает отсутствия необходимости в новых еще более эффективных методах. Разработка и широкое внедрение в ПД новых молекулярно-цитогенетических методов (различные варианты метода FISH), доимплантационной диагностики, молекулярных методов диагностики хромосомных болезней – наглядное тому подтверждение (см. главу XIV). Важно, однако, подчеркнуть, что дальнейшее повышение эффективности ПД на современном этапе не зависит от методических трудностей, но определяется только состоянием финансирования всей службы ПД и успешным решением многих организационных проблем.

1.2. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ГРУЗ И ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ВНЗ

Под генетическим грузом понимают частоту и распространенность среди населения наследственных и отчасти – врожденных хронических болезней (Бочков Н.П., 2004). Генетический груз проявляется как бесплодие и спонтанные аборт, выкидыши и мертворождения, врожденные пороки, антигенная несовместимость матери и плода (Новиков П.В., Вельтищев Ю.Е., 2002). Генетический груз в постнатальном периоде определяется, прежде всего, уровнем моногенных и мультифакториальных болезней с выраженной наследственной предрасположенностью. Проявления генетического груза в отечественной популяции, по данным проф. Ю.Е.Вельтищева, приведены в таблице 1.1. По мнению академика Н.П.Бочкова (2001), в структуре младенческой и детской смертности генетически детерминированные болезни составляют примерно 37%. Из них около 10% детей умирает от моногенных болезней, 26–27% детей гибнут в результате сочетания неблагоприятных генетических и средовых факторов. Следует подчеркнуть, что согласно обобщенным мировым данным, частота ВПР составляет 3,5%, моногенных болезней – 1,4% и хромосомных синдромов – около 0,6% (Carrega I.M., Di Renzo G.C., 1993). Эти величины могут существенно варьировать в зависимости от места проживания, этнических особенностей, социально-экономических факторов и методов сбора информации.

Основным вкладом ПД в здравоохранение явилось бы реальное снижение генетического груза популяции и, прежде всего, таких его показателей, как величина перинатальных потерь, частота хромосомных и генных болезней.

Таблица 1.1

**Проявления генетического груза популяции
(Вельтицев Ю.Е., 1996)**

| Проявление | Характеристики |
|---|--|
| 1. Пренатальный генетический груз | |
| Самопроизвольные аборты | 20% всех беременностей (в том числе 50% вызвано мутациями хромосом и 50% – доминатными генными мутациями) |
| Мертворождения | 2 на 1000 родившихся. Хромосомные аномалии у 6%, частота генных мутаций неизвестна Большое значение имеют многофакторные (полигенные) болезни матерей |
| Рождение незрелого плода | 7–8% беременностей. Многофакторные болезни матери, антигенная несовместимость матери и плода |
| Гемолитическая болезнь новорожденных | Резус-конфликт у 2–3 на 1000 новорожденных, АВО-конфликт у 5–6 на 1000 |
| Врожденные пороки | Моногенная природа в 10%, в подавляющем большинстве – многофакторный генез |
| 2. Постнатальный генетический груз | |
| Моногенные болезни, всего <i>в том числе:</i> аутосомно-доминантные аутосомно-рецессивные | 10:1000 7:1000 2,5:1000 |
| X-сцепленные | 0,4:1000 |
| Мультифакториальные болезни | до 25:100 |
| Хромосомные болезни, всего | 6:1000 |
| Аномалии половых хромосом | 1:400 мальчиков, 1:600 девочек |
| <i>В том числе:</i> синдром ломкой X-хромосомы синдром Клайнфелтера, XXУ синдром Тернера–Шерешевского, XO | 1:1250 мальчиков, 1:2500 девочек 1:750 мальчиков 1:3000 девочек |
| <i>Аномалии аутосом, в том числе:</i> болезнь Дауна (трисомия 21) синдром Патау (трисомия 13) синдром Эдвардса (трисомия 18) | 1:600 1:7000 1:6000 |

Между тем, известно, что частота перинатальных потерь в России, несмотря на некоторые региональные различия, составляет в среднем около 13% (Айламазян Э.К., 1998). Третье место в структуре перинатальной смертности устойчиво занимают врожденные аномалии. На их долю приходится около 15%. Примерно 7% мертворождений обусловлено хромосомными аномалиями. Анализ мирового опыта показывает, что даже наиболее эффективная организация службы ПД по выявлению ВНЗ не оказывает заметного влияния на величину перинатальных потерь. Вместе с тем, *ПД может реально влиять на величину генетического груза и, прежде всего, на частоту хромосомных и некоторых наиболее распространенных моногенных болезней, особенно наследуемых по аутосомно-доминантному или Х-сцепленному типу (см. главу XIII)*. Так, благодаря хорошей организации скринирующих программ (биохимический, ультразвуковой скрининг беременных) и эффективной инвазивной диагностике хромосомных и генных болезней в некоторых странах Западной Европы (Дания, Голландия, Великобритания) уже удалось реально снизить, а в отдельных регионах даже полностью ликвидировать рождение детей с хромосомными болезнями (синдромом Дауна) и аномалиями нервной системы типа ДЗНТ. Усилиями службы ПД Санкт-Петербурга в 2004 г. удалось предотвратить рождение 33 плодов с болезнью Дауна и почти вдвое снизить частоту этого тяжелого наследственного заболевания (Баранов В.С. и др., 2004).

В России ежегодно проходят УЗИ около 370 000 беременных. Суммарная частота выявленных с помощью УЗИ пороков развития составила 4,1%. Выявлено в общей сложности 6730 ВПР (Новиков П.В., 2004). В 2002 г. определение маркерных сывороточных белков (МСБ) проведено в 403 581 исследовании. Отклонения показателей МСБ наблюдались в 6,8–14% случаев, причем из них в 9% случаев были установлены хромосомные нарушения. Отмечается устойчивый рост числа инвазивных ПД, выполняемых на материале плода, — от 5 569 в 2001 г. до 8 949 в 2002 г. Логично предполагать, что в 2004 г. число операций с целью получения плодного материала в РФ уже перевалило за 10 000. Только в нашем центре число инвазивных вмешательств с целью ПД хромосомных и моногенных болезней превысило 1000 в 2004 г.

Согласно статистическим данным, ежегодно в РФ благодаря ПД выявляется около 8000 различных отклонений в раз-

витии плода, из них более 4 000 ВПР и более 400 хромосомных болезней.

Если учесть, что ежегодно в России рождается около 2 400 больных с синдромом Дауна (Бахарев В.А., 2004), использованы еще не все возможности для дальнейшего повышения эффективности службы ПД в России. К сожалению, эта перспективная и высокорентабельная область профилактической медицины пока не достигла необходимого уровня. Между тем, принимая во внимание явную тенденцию к росту частоты ВПР в России за последние 20 лет (от 5% в 1987 г. до 11,8% в 2000 г.) (Романенко О.П., Ключева С.К., 2004), неблагоприятную демографическую ситуацию в стране, связанную с прогрессивным сокращением населения, падением рождаемости (от 13,4 на 1000 в 1990 г. до 9,1 на 1000 в 2001 г.), нет сомнений в том, что именно «профилактика должна стать определяющей в дальнейшем развитии системы здравоохранения» (Стародубов В.И., 2003). Достойное место в этой новой стратегии отечественной медицины должно принадлежать службе ПД.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пренатальная диагностика — направление медицинской генетики, возникшее на стыке акушерства и генетики человека, в задачи которого входят диагностика, профилактика, а в перспективе, и лечение ВНЗ на ранних стадиях развития. С помощью ПД реализуется 2-й, наиболее эффективный уровень медико-генетической профилактики ВНЗ. В практическом плане ПД представляет собой комплекс врачебных мероприятий и диагностических методов, направленных на выявление и предупреждение морфологических, структурных, функциональных или молекулярных нарушений внутриутробного развития человека. Последние могут проявляться как в виде изолированных или множественных врожденных уродств, дисрупций, деформаций, недоразвитий, хромосомных или моногенных болезней, так и в виде пороков или дисфункций жизненно важных систем, органов и тканей, которые ведут к гибели плода или к тяжелым, нередко смертельным, заболеваниям в постнатальном периоде. Возможность получения зародышевого материала и его анализ при помощи современных молекулярных, цитологических, биохимических и других методов на любой стадии внутриутробного раз-

вития позволяют не только установить точный диагноз у плода, но и получить принципиально новую информацию о тонких механизмах эмбрионального развития человека. Поэтому ПД — это не только набор диагностических методов и приемов, но и основа нового научного направления по изучению фундаментальных проблем биологии развития (эмбриологии) человека. В научном плане ПД сегодня — это современная эмбриология и генетика эмбриогенеза человека.

Рассмотрены основные четыре этапа становления и развития ПД. Отмечается, что благодаря усовершенствованиям скринирующих программ, безопасности и эффективности инвазивных методов получения плодного материала на любом сроке беременности, большим диагностическим возможностям лабораторной базы, ПД вступила в XXI век с уже решенными основными проблемами. Дальнейшее повышение эффективности ПД не зависит от методических трудностей, но определяется только состоянием финансирования всей службы ПД и успехами в решении ее организационных проблем.

Прогресс ПД в плане выявления ВНЗ, скорее всего, не приведет к снижению перинатальных потерь, однако может оказать заметное влияние на величину генетического груза популяции и, прежде всего, на частоту хромосомных и генных болезней.

ГЛАВА II. ОСНОВЫ ПРОЭМБРИОНАЛЬНОГО И ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА

Исследования по цитогенетике эмбрионального развития человека, а также грамотное применение всего комплекса методов, связанных с инвазивной ПД (забор материала, цитогенетический анализ, молекулярные исследования и пр.), предусматривают достаточную компетентность ученого и врача-генетика в вопросах антенатального развития человека. Такая информация особенно существенна для понимания тех этапов онтогенеза, когда происходят нарушения кариотипа, реализующиеся во время развития плода и в постнатальном периоде. Она, несомненно, важна и для понимания патогенетических механизмов возникновения хромосомных aberrаций и врожденных пороков развития, выявляемых у развивающегося зародыша.

Общая продолжительность внутриутробного развития человека составляет в среднем около 280 дней и равна примерно 1,8% его средней продолжительности жизни. Существует несколько различных классификаций периодов антенатального развития человека (Кнорре А.Г., 1967; Бодемар Ч., 1971; Дыбан А.П., Баранов В.С., 1978; Exalto N. et al., 1983; Papp Z., 1990). Согласно ставшей классической классификации Института Карнеги (США), разработанной на основе уникальной коллекции зародышей человека, эмбриогенез человека подразделяют на стадии, которые обозначают по имени основоположника коллекции как «горизонты Стритера» (Пэттен Б., 1959; Карлсон Б., 1983). Эти «горизонты», основанные на гистологическом описании уникальных находок, до имплантации обозначают арабскими, а после имплантации — римскими цифрами. Всего выделяют 23 «горизонта» (Jirasek J.E., 1985). При этом первые 8 горизонтов (с 1-го по 20-й дни развития (д.р.)) соответствуют периоду бластогенеза (преэмбриональный период развития), остальные 15 «го-

ризонтов» (IX–XXII – с 20-го по 60-й день развития) – периоду раннего органогенеза (эмбриональный период). Горизонты Стритера не распространяются на фетальный (60–180-й дни развития – стадия XXIII) и перинатальный периоды (180–280-й дни развития). Данная классификация основана на исследовании зародышей при достаточно точной регистрации срока зачатия. Естественно, что эти периоды отличаются от таковых при стандартной регистрации сроков беременности, принятой в акушерстве (+ 2 нед. от 1-го дня последних месячных). Соответственно проэмбриональный период согласно классификации Карнеги примерно соответствует первым четырем неделям беременности (н.б.), эмбриональный – 5–9 н.б., плодный – 9–40 н.б. В практическом акушерстве используется более упрощенный вариант классификации, согласно которому I триместр беременности (до 13-й н.б.) соответствует эмбриональному периоду развития, II и III – фетальному (плодному) периоду. В последнем нередко принято выделять еще и перинатальный период – с 28-й н.б. до 7-го дня периода новорожденности (Айламазян Э.К., 1998).

С учетом целей и задач монографии в данной главе мы выделяем следующие периоды: проэмбриональный (гаметогенез), преэмбриональный (первые 20 д.р.), собственно эмбриональный или период раннего органогенеза (с 21 по 60-й д.р.) и плодный (после 60-го д.р. до конца беременности). С учетом поправки на срок беременности, принятой в акушерстве (см. выше), рассматриваемые периоды приблизительно соответствуют: проэмбриональный – 1–4-я н.б., период раннего (активного) органогенеза 5–12-я н.б. включительно и плодный с 13-й по 40-ю н.б. Основные морфологические характеристики зародышей человека с 1-й по 23-ю стадии развития по классификации Карнеги (от оплодотворения до плодного периода) приведены в таблице 2.1.

2.1. ПРО- И ПРЕЭМБРИОНАЛЬНЫЙ ПЕРИОДЫ РАЗВИТИЯ (1–4 н.б.)

Принимая во внимание важность процессов гаметогенеза и начальных этапов эмбриогенеза в этиологии и патогенезе хромосомной патологии, в данном разделе будут рассмотрены: гаметогенез, оплодотворение, доимплантационные стадии развития и имплантация.

Основные морфологические характеристики зародыша человека с 1-й по 23-ю стадии развития по классификации Карнеги (проэмбриональный период – стадии 1–8; эмбриональный период – стадии IX–XXII, ранний фетальный период (стадия XXIII))

| Стадия по Карнеги | Возраст зародыша, дни | Менструальный возраст +2 нед. | КТР, мм | Морфологические особенности |
|--------------------------------|-----------------------|----------------------------------|---------|---|
| Проэмбриональный период | | | | |
| I | 0–2 | 2 ⁰ | 0,2 | Оплодотворение, зигота |
| II | 2–4 | 2 ⁺² –2 ⁺³ | 0,2 | От 2 до 16 бластомеров |
| III | 4–5 | 3 ⁻³ –3 ⁻² | 0,2 | Стадия компактизации, ранняя бластоциста, образование трофобласта и внутренней клеточной массы (ВКМ) |
| IV | 5–6 | 3 ⁻² –3 ⁻¹ | 0,2 | Освобождение от блестящей оболочки («хэтчинг»), начало имплантации |
| V | 6–7 | 3 ⁰ –4 ⁻² | 0,2 | Деламинация (расслоение) внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты с образованием эктодермы и энтодермы (1-я фаза гастрюляции); первичный желточный мешок (ЖМ); разрастание трофобласта, начало образования ворсин |
| VI | 7–15 | 4 ⁻¹ –4 ⁺¹ | 0,2–0,4 | Вторичный ЖМ, эмбриональный диск грушевидной формы, 2-я фаза гастрюляции, первичная полоска, кровяные островки в стенке ЖМ |
| VII | 16–18 | 4 ⁺¹ –4 ⁺³ | 0,4 | Формирование трех зародышевых листков, появление хорды |
| Эмбриональный период | | | | |
| VIII | 18–20 | 4 ⁺³ –5 ⁻² | 1,0–1,5 | Формирование нервной пластинки, нервного желобка, образование первичных сосудов |
| IX | 20–21 | 5 ⁻² –5 ⁰ | 1,5–2,5 | Первые сомиты (3 пары), вторичные ворсинки, начало формирования сердца, появление предпочки |

Таблица 2.1 (продолжение)

| Стадия по Карнеги | Возраст зародыша, дни | Менструальный возраст +2 нед. | КТР, мм | Морфологические особенности |
|-------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------|--|
| X | 21–22 | 5 ⁺¹ –5 ⁺² | 2,0–3,5 | 4–12 сомитов, нервные валики начинают смыкаться в средней части, появляются 2 пары жаберных дуг, зачатки глаз, слуховые плакоды |
| XI | 22–26 | 5 ⁺² –6 ⁻² | 2,5–4,5 | 13–20 сомитов, нейропоры открыты, 3–4 пары жаберных дуг, эмбрион приобретает С-образную форму, сердечная трубка S-образная, ритмично сокращается |
| XII | 26–30 | 6 ⁻² –6 ⁺² | 3,0–5,0 | 21–29 сомитов, определяются почки верхних конечностей, закрывается задний нейропор, закладываются печень, поджелудочная железа, пищевод, трахея, легкие, клапаны и перегородка сердца, начинается развитие мышц, костей |
| XIII | 28–32 | 6 ⁰ –7 ⁻³ | 4,0–6,0 | 30–40 сомитов, появляются почки нижних конечностей, удлиняются и дифференцируются почки верхних конечностей, формируются слуховые пузырьки, передний, средний и задний мозг, аортальные дуги |
| XIV | 31–35 | 6 ⁺³ –7 ⁰ | 5,0–7,0 | Верхняя конечность разделяется на плечо и предплечье, определяется зачаток кисти, видны мандибулярные и гиоидные дуги, ротовая ямка, сердце 4-камерное, формируются зачатки легких, закладка третичной (постоянной) почки, мочевого пузыря |
| XV | 35–38 | 7 ⁰ –7 ⁺³ | 7,0–10,0 | Размеры мозга увеличиваются на 1/3, передний нейропор закрыт, видны 4 пары жаберных дуг, определяются мандибулярные и максиллярные дуги, носовые ямки, формируются стопы, гонады заселяются первичными половыми клетками (ППК) |
| XVI | 37–42 | 7 ⁺² –8 ⁰ | 8,0–12,0 | Пигментация глаз, начало оксификации костей, закладываются зубная пластинка и зачатки зубов, дифференцированы основные части конечностей |
| XVII | 42–44 | 8 ⁰ –8 ⁺² | 11,0–14,0 | Определяются закладки пальцев верхних конечностей, формируется диафрагма, появляется половой бугорок, почки начинают вырабатывать мочу |
| XVIII | 44–47 | 8 ⁺² –9 ⁻¹ | 13,0–17,0 | Определяются бедро, голень, пальцы нижних конечностей, срастаются веки, появляются соски |

| Стадия по Карнеги | Возраст зародыша, дни | Менструальный возраст +2 нед. | КТР, мм | Морфологические особенности |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|---------------------|--|
| XIX | 47–51 | 9 ⁻¹ –9 ⁺² | 16,0–18,0 | Туловище удлиняется и несколько выпрямляется; определяются полушария мозга, ушные раковины расположены низко, глаза в боковых частях головы, развивается задний мозг |
| XXI | 52–56 | 10–3–10–2 | 22,0–24,0 | Поздняя эмбриональная стадия, конечности хорошо дифференцированы, пальцы рук сжимаются, завершается формирование межпредсердной перегородки |
| XXII | 56–60 | 10 ⁻² –10 ⁰ | 23,0–28,0 | Глаза открыты, появляются первые извилины мозга, возникают произвольные движения, возможно распознавание пола по гонадам, кишка из пупочного канатика втягивается в брюшную полость |
| Ранний фетальный период | | | | |
| XXIII | 60–182 60–70 | 10 ⁰ –12 ⁺³ | 27,0–200,0 27–45 | Масса тела (МТ) около 10 г. Глаза закрыты веками, сформирована верхняя губа, формируется твердое небо, исчезает естественная пупочная грыжа, появляются очаги окостенения в длинных трубчатых костях, конечности хорошо сформированы, пальцы разделены |
| | 70–77 | | 50,0–70,0 | МТ около 20–40 г. Увеличивается масса мозга, голова наклонена вперед, гениталии дифференцированы по половому признаку, объем амниотической жидкости около 50 мл |
| | 77–90 | | 70,0–90,0 | МТ 45–60 г. Плод начинает двигаться, хорошо прослушивается сердцебиение, развиваются зубы, растут волосы, дифференцируются бронхи |

2.1.1. Гаметогенез

Все половые клетки млекопитающих и человека берут начало от первичных половых клеток (ППК) – гоноцитов. Происхождение ППК до настоящего времени окончательно не выяснено. Не вызывает, однако, сомнения, что эти клетки возникают значительно раньше, чем появляются зачатки гонад, т.е. они имеют экстрагонадное происхождение. Согласно существующим представлениям, ППК могут быть обнаружены в первичной полоске уже на 16–18-й день развития, затем они перемещаются в желточную (внезародышевую) энтодерму у основания аллантаоиса, мигрируют в энтодерму средней кишки, откуда и попадают в половые валики – зачатки гонад (Семенова-Тянь-Шанская А.Г., Кнорре А.Г., 1971; Дыбан А.П., Баранов В.С., 1978; Дыбан А.П., 1988). В последнее время получены данные о том, что ППК выделяются в самостоятельный эмбриональный зачаток значительно раньше, еще во время дробления и формирования бластоцисты.

Попав в зачатки гонад примерно на 7-й н.б., гоноциты впервые обнаруживают признаки полового диморфизма. При формировании мужских гонад (семенников) они окружаются клетками целомического эпителия, образуя так называемые «половые тяжи», в составе которых пребывают в латентном, недифференцированном состоянии (сперматогонии) вплоть до начала полового созревания.

В случае женского пола (набор гоносом XX) гоноциты задерживаются в наружном, корковом слое мезенхимной ткани половых валиков, активно пролиферируют, вступают в мейоз, после чего каждая из них окружается фолликулярными клетками, и в виде ооцитов 1-го порядка сохраняются до полового созревания. Принципиальная схема гаметогенеза у млекопитающих и человека приведена на рисунке 2.1.

2.1.2. Сперматогенез

Общая продолжительность сперматогенеза у человека составляет 72 дня. За это время стволовые клетки сперматогенного ряда (сперматогонии), находящиеся в глубине извитых семенных канальцев, проходят длительный путь дифференцировки до зрелых, практически лишенных цитоплазмы, сперматозоидов, содержащих гаплоидный набор хромосом. В процессе сперматогенеза различают две фазы, тестикулярную и эпидидемальную. Во время первой – происходят ос-



Рис. 2.1. Принципиальная схема сперматогенеза (слева) и оогенеза (справа) у млекопитающих и человека.

новые этапы дифференцировки сперматогониев в сперматозоиды. Во время второй — завершается созревание спермиев, в результате накопления мукополисахаридов, холестерина, других защитных белков, меняются свойства наружных мембран, спермии приобретают подвижность.

Сперматогенез (тестикулярная фаза) включает два последовательных этапа: собственно сперматогенез и спермиогенез. Тестикулярная фаза — контролируется гормонами гипофиза (фолликулостимулирующим и лютеотропным) и собственными гормонами семенников — тестикулярными андрогенами (тестостерон, андростендион и др.), которые продуци-

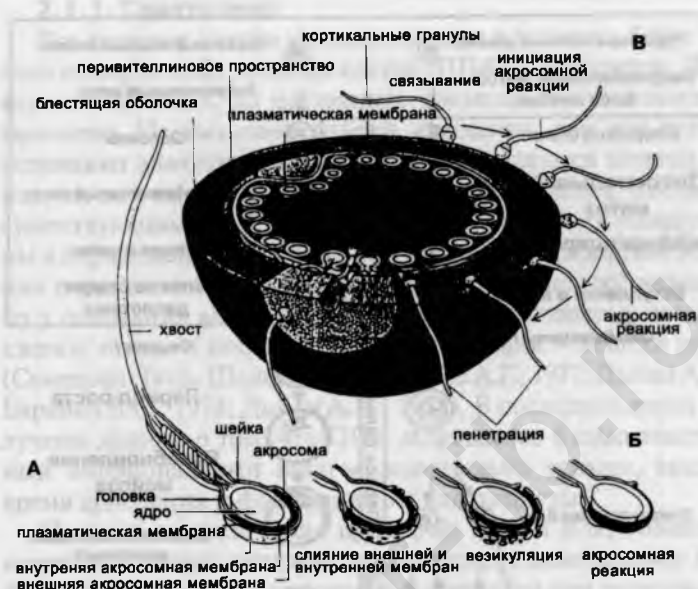


Рис. 2.2. Строение зрелого сперматозоида (А), акросомная реакция (Б), последовательные этапы оплодотворения (В).

руются клетками Лейдига, находящимися в строме извитых семенных канальцев.

На 1-м этапе вступающие в мейоз клетки (сперматоциты 1-го порядка) претерпевают два последовательных мейотических деления. При этом из одного сперматоцита 1-го порядка возникает 4 клетки (сперматиды) с гаплоидным числом хромосом (рис. 2.1). Отметим, что из одного сперматогония типа В в результате 5 митотических, а затем и 2 делений мейоза образуется 104 сперматиды. Все процессы дифференцировки проходят в стенке извитых семенных канальцев. При этом клетки сперматогенного ряда находятся непосредственно в цитоплазме клеток Сертоли, которые обеспечивают питание сперматоцитов и сперматид.

Во время спермиогенеза гаплоидные клетки — сперматиды — проходят ряд последовательных стадий дифференцировки (фаза Гольджи, фаза колпачка, акросомная фаза, фаза созревания). Они утрачивают цитоплазму, формируют специальные органоиды (хвост, шейку, акросому) (рис. 2.2, А).

Акросома возникает непосредственно из мембран аппарата Гольджи, покрывает в виде колпачка переднюю часть головки спермия (примерно до ее середины) и содержит набор литических лизосомных ферментов, важных для оплодотворения (рис. 2.2, А).

Особенно существенные изменения происходят непосредственно в ядре клеток. ДНК в составе хромосом утрачивает типичную для соматических клеток нуклеосомную организацию. Гистоновые белки, характерные для функционально активной ДНК, заменяются на кислые белки, богатые аргинином и протаминами. Спирализация ДНК достигает максимальной величины. *Ежедневно у человека активного репродуктивного возраста продуцируется около 10 млн. зрелых сперматозоидов.*

2.1.3. Оогенез

В отличие от мужских половых клеток родоначальники женских половых клеток — оогонии — претерпевают важнейшие стадии дифференцировки, включая все этапы профазы мейоза (рис. 2.1), еще во внутриутробном периоде развития. Более подробно временные и цитогенетические характеристики мейоза у зародышей женского пола и у половозрелых женщин представлены на рисунке 2.3. Временные особенности основных периодов оогенеза у человека приведены в таблице 2.2. Достигнув зачатков будущих яичников (половых валиков) примерно к концу 1-го — середине 2-го месяца беременности, гоноциты теряют амебоидную подвижность, вступают в контакт с клетками фолликулярного эпителия и преобразуются в оогонии. В течение последующих 3—4 месяцев оогонии активно делятся митозом. В результате их число возрастает от исходных 1500—2000 клеток до нескольких миллионов. Максимальное число оогониев (до 7 млн.) находится в яичниках плодов женского пола на 7-м месяце беременности. Сразу же за периодом размножения следует апоптоз — запрограммированная гибель большей части оогониев. Причины апоптоза остаются невыясненными. Неясна и селективная роль такой массовой клеточной гибели. Возможно, погибают те оогонии, которые по тем или иным причинам не могут трансформироваться в ооциты и вступить в мейоз, либо, что кажется более правдоподобным, гибнущие клетки — это ооциты, находящиеся уже в профазе мейоза.

Таблица 2.2

Временные особенности основных периодов оогенеза у разных млекопитающих и человека (Дыбан А.П., Баранов В.С., 1978).

| Объект | Вступление ооцитов в мейоз | Размножение оогониев | Рост ооцитов | | Созревание ооцитов, ч |
|--------------------|----------------------------|----------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|
| | | | Профаза мейоза | диктиотена | |
| Человек | Асинхронное | 2–5 мб | 2,5–8 мб | 8–9 мб – 13,5–14 лет | 54–60 |
| Макака | – | 2–5 мб | 2–6 мб | 5 мб – 2–3 года | 54–60 |
| Мышь | Синхронное | 10–14 дб | 14–20 дб | 2–3 дпр – 1,5 мпр | 16–20 |
| Крыса | – | 14–17 дб | 17,5 дб – 4 дпр | 5 дпр – 1,5 мпр | 16–20 |
| Кролик | – | 14–2 дпр | 3–20 дпр | 20 дпр – 4–5 мпр | 15–18 |
| Золотистый хомячок | – | 10–17 дб | 1–9 дпр | 10 дпр – 1,5 мпр | 16–20 |

Примечание. Периоды оогенеза даны в соответствующих стадиях онтогенеза: дб – дни беременности, дпр – дни после рождения, мб – месяцы беременности, мпр – месяцы после рождения.

Количество женских половых клеток к концу беременности и у новорожденных уменьшается в среднем до 2 млн., к 7 годам – до 300 тыс., а к началу полового созревания – до 40 тыс. Реально в течение всей жизни овулирует не более 400–500 ооцитов. Значительная часть естественной убыли женских половых клеток происходит в результате апоптоза оогониев, другие погибают уже внутри атретических фолликулов, которые не доходят до овуляции. Уместно также отметить, что в отличие от млекопитающих процессы оогенеза у человека протекают асинхронно, а потому значительно растянуты во времени.

Уже с 3-го месяца беременности часть оогониев завершает циклы митотических делений, трансформируется в ооциты и вступает в период роста. Они увеличиваются в размерах, окружаются фолликулярными клетками, вступают в профазу мейоза (рис. 2.3). Однако в отличие от мужского мейоза в оогенезе вслед за профазой не наступает метафаза, а мейоз

блокируется, и ооциты надолго, вплоть до начала полового созревания переходят в состояние покоя — **диктиотену**. Предполагается, что блокада мейоза связана с действием особых факторов, секретлируемых соматическими (фолликулярными) клетками гонады (Дыбан А.П., 1988). Окруженные одним слоем фолликулярных клеток ооциты образуют так называемые первичные (примордиальные) фолликулы.

До полового созревания длится период медленного роста, во время которого прогрессивно увеличивается число слоев фолликулярных клеток, окружающих ооцит на стадии покоя. Ядро ооцита (на этой стадии очень крупное, светлое) иногда называется **зародышевым пузырьком**. Характерной структурой такого ядра у человека являются **ламповые щетки** — петли ДНК, на которых происходит активный синтез РНК-комплексов, откладывающихся в ооплазме до момента оплодотворения. Размеры ооцита по мере увеличения числа фолликулярных клеток также увеличиваются. Рост самого ооцита прекращается только с началом периода быстрого роста его фолликула, что совпадает с периодом полового созревания. В это время внутри фолликула образуется полость (антрум), которая заполняется жидкостью. Ее размеры быстро увеличиваются. Фолликул превращается в Граафов пузырек (Дыбан А.П., Баранов В.С., 1977).

Созревание ооцитов начинается с возобновления мейоза и заканчивается только после оплодотворения, когда завершается 2-е мейотическое деление (рис. 2.3). С наступлением активного репродуктивного возраста ооциты группами (5–10 штук) вступают в мейоз, однако в большинстве случаев в каждом цикле овулирует только один, наиболее продвинутый в развитии доминантный фолликул, тогда как ооциты в остальных фолликулах, вступившие в период созревания, прекращают развитие и подвергаются атрезии.

Рост и созревание фолликулов с находящимися в них ооцитами находятся под гормональным контролем как со стороны гипофиза (фолликулостимулирующий гормон — ФСГ, лютеотропный гормон — ЛГ) и гипоталамуса (пролактин — гонадотропин — релизинг гормон), так и самого яичника (эстрогены — гормоны фолликулярных клеток, прогестерон — гормон желтого тела). При этом период роста ооцитов, особенно период быстрого роста, контролируется преимущественно ФСГ, а период созревания — ЛГ. Примерно за сут-



Рис. 2.3. Цитогенетические и временные характеристики профазы мейоза у плодов женского пола и стадий созревания яйцеклеток после полового созревания.

ки до овуляции, т.е. до разрыва Граафова пузырька и выхода ооцита, отмечается пик подъема ЛГ.

Контролирующие механизмы оогенеза и особенности гормональной регуляции этого процесса подробно рассмотрены в ряде обстоятельных монографий и обзоров (Дыбан А.П., Баранов В.С., 1977; Курило Л.Ф., 1980; Kurilo L.F., 1981; Дыбан А.П., 1988; Никитин А.И., Воробьева О.А., 1988).

2.2. ОПЛОДОТВОРЕНИЕ (24 ч)

Кульминационным моментом зарождения новой жизни является встреча мужских и женских гамет.

Примерно через сутки после подъема в крови женщины уровня ЛГ отмечается набухание и разрыв «зародышевого пузырька» (ядра ооцита), возобновляется мейоз, отделяется 1-е полярное тельце. Во время овуляции происходит разрыв Граафова пузырька, и ооцит на стадии метафазы II, окруженный «лучистым венцом» (*corona radiata*) из гранулезных клеток яйценосного бугорка (*cumulus*), попадает в ампулярную часть яйцевода, где обычно и происходит оплодотворение. Собственные оболочки овулировавшей яйцеклетки представлены

блестящей оболочкой (*zona pellucida*) и плазматической (вителлиновой) мембраной, непосредственно прилегающей к ооплазме (рис. 2.2, В). Блестящая оболочка имеет преимущественно мукополисахаридную природу и является продуктом как самого ооцита, так и питающих его фолликулярных клеток. Ее важной особенностью является наличие особых белков — гликопротеинов ZP1, ZP2 и ZP3, ответственных за видовую специфичность оплодотворения.

Овулировавший ооцит безусловно является самой крупной клеткой организма. Его диаметр без блестящей оболочки составляет 110–120 мкн, с блестящей оболочкой — 140–150 мкн.

Сперматозоиды приобретают способность к оплодотворению только после нескольких часов пребывания в половых путях женщины. Во время их продвижения по яйцеводам происходит удаление с наружной плазматической мембраны защитных белков, мукополисахаридов (в том числе — фактора **декапацитации**) и холестерина. В результате этих процессов, получивших название **реакции капацитации**, изменяется электрический заряд наружной мембраны, усиливается потребление кислорода, возрастает подвижность сперматозоидов. Капацитация *in vitro* может быть получена путем инкубации в течение нескольких часов отмытых от слизи сперматозоидов в солевом растворе при +37°C.

Считается, что *in vivo* место оплодотворения в яйцеводе достигают только несколько сперматозоидов из общего числа 30–40 млн. клеток в одном эякуляте. **Сперматозоиды могут сохранять способность к оплодотворению в течение нескольких дней, а по некоторым наблюдениям — до 1 недели.**

Основные биологические барьеры на пути проникновения спермия в овулировавшую яйцеклетку представлены клетками лучистого венца, блестящей (*zona pellucida*) и плазматической (вителлиновой) оболочками яйцеклетки (рис. 2.2, В).

Преодоление лучистого венца (*corona radiata*) достигается активным движением самого сперматозоида, а также за счет растворения и разжижения межклеточного мукополисахаридного матрикса гиалуронидазой, выделяемой акросомами погибших спермиев.

Пройдя через *corona radiata*, сперматозоид вначале неспецифически, а затем специфически связывается с поверхностью блестящей оболочки. Происходит так называемая «акро-

сомная реакция»: в результате разрушения наружной акросомной мембраны спермия высвобождается набор литических ферментов (гиалуронидаза, акрозин, нейраминидаза), которые и обеспечивают пенетрацию блестящей оболочки (рис. 2.2, Б). Общая продолжительность акросомной реакции составляет 10–15 мин. Естественно, что преодоление блестящей оболочки, являющейся наиболее серьезным естественным барьером, требует изначально наличия интактной нормальной акросомы. Сперматозоиды с неправильной формой головки или с нарушенной акросомой не способны к естественному оплодотворению.

Пройдя через блестящую оболочку, сперматозоид связывается своей постакросомальной областью (экваториальным сегментом) с микрофиламентами вителлиновой оболочки и погружается внутрь ооплазмы путем пиноцитоза, т.е. без разрушения целостности наружной мембраны яйцеклетки.

Присоединение сперматозоида к **плазматической мембране** сопровождается сложной ответной реакцией яйцеклетки, получившей название **«кортикальной реакции»** или **«реакции активации»**. Подобно волне она распространяется по поверхностному слою яйцеклетки от места проникновения первого сперматозоида. Ее начало знаменуется локальным повышением концентрации ионов Ca^{++} , которое стимулирует распад находящихся в кортикальном слое ооплазмы лизосомоподобных структур — **кортикальных гранул**, содержимое которых (протеиназы, пероксидазы, нейраминидаза) быстро достигает сначала плазматической, затем и блестящей оболочек. При этом происходит сокращение кортикального слоя ооплазмы, в результате между блестящей и плазматической оболочками появляется **перивителлиновое пространство**. В самой блестящей оболочке наблюдается быстрое разрушение рецепторных гликопротеинов ZP3, что делает невозможным прикрепление и проникновение в яйцеклетку других сперматозоидов (**блок полиспермии**). Реакция активации приводит к снятию мейотического блока, быстрому завершению яйцеклеткой 2-го деления созревания и отделению в перивителлиновое пространство 2-го направительного полярного тельца. Головка спермия, попавшая в ооплазму в результате оплодотворения, и оставшийся после 2-го мейотического деления созревания гаплоидный набор хромосом яйцеклетки трансформируются, соответственно, в мужской и женский **пронуклеусы**. Оплодотворение, продол-

жительность которого не превышает 24 ч, завершено. Начинается индивидуальное развитие нового организма.

2.3. ДОИМПЛАНТАЦИОННЫЙ ПЕРИОД (1–6 д.р./1 н.б.)

Доимплантационное развитие у человека занимает в среднем около 6–7 дней. Фотографии зародышей человека доимплантационных стадий развития (от зиготы до бластоцисты) приведены на рисунке 2.4.

Собственно *развитие зародыша начинается с формирования мужского и женского пронуклеусов*. При этом мужской пронуклеус формируется несколько раньше женского (8 ч после оплодотворения). Деконденсация его хромосом выражена

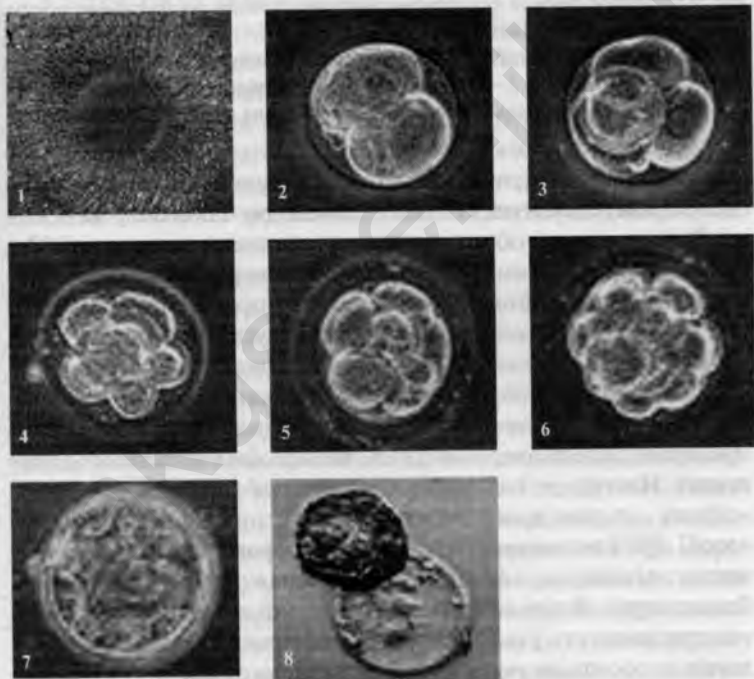


Рис. 2.4. Прижизненные фотографии зародышей человека доимплантационного периода развития. Фазовый контраст. Ув. 10×20:

1 – яйцеклетка, 2 – 2 бластомера, 3 – 4 бластомера, 4 – 8 бластомеров, 5 – морула, 6 – компактизирующая морула, 7 – бластоциста, 8 – «вылупление» бластоцисты из блестящей оболочки. (Любезно предоставлены д.м.н. В.С. Корсаком.)

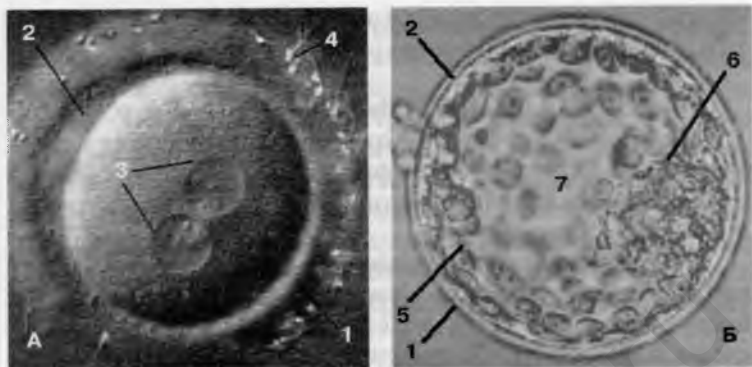


Рис. 2.5. Прижизненные фотографии зародышей человека на стадии зиготы (А) и на стадии бластоцисты (Б):

1 – блестящая оболочка, 2 – перивителлиновое пространство, 3 – пронуклеусы, 4 – сперматозоиды, 5 – трофобласт, 6 – эмбриобласт (внутренняя клеточная масса), 7 – бластоцель. (Любезно предоставлены д.м.н. В.С.Корсаком.)

в большей степени, чем женского. В результате размеры мужского пронуклеуса несколько превосходят таковые у женского. Формирование обоих пронуклеусов завершается через 12 ч после оплодотворения (рис. 2.5, А). Уже через 9 ч в обоих пронуклеусах начинается синтез ДНК, т.е. происходит репликация хромосом. Через 20 ч оба пронуклеуса встречаются примерно в центре ооплазмы. Хромосомы конденсируются и приблизительно через 30 ч после оплодотворения, когда растворяются ядерные оболочки, хромосомный материал обоих пронуклеусов объединяется в одной метафазной пластинке (**сингамия**). Наступает 1-е деление дробления (рис. 2.4, 2). Дальнейшие деления дробления происходят примерно каждые 18 часов, причем уже со стадии 2 **бластомеров** (рис. 2.4, 2) отмечается некоторая асинхронность ритма дробления разных бластомеров. В течение 3 первых делений дробления все бластомеры имеют округлую форму, идентичны по своей морфологии и ростовым потенциям. На **стадии морулы** (3–5-й дни развития) (рис. 2.4, 5, б) зародыш состоит из 8–16 бластомеров, начинается **процесс компактизации**, сопровождающийся поляризацией бластомеров. При этом бластомеры, расположенные снаружи, приобретают свойства эпителиальных клеток, между ними возникают тесные межклеточные контакты (**десмосомы**), а внутри зародыша начинает накапливаться

жидкость. Так через 4,5–5 дней после оплодотворения возникает **бластоциста** — небольшой пузырек, заполненный жидкостью, стенка ее состоит из одного слоя крупных клеток трофобласта, изнутри к которому в одном месте прилежит небольшая группа клеток эмбриобласта (**внутренняя клеточная масса — ВКМ**) (рис. 2.4, 7; рис. 2.5, Б). Общее число клеток на этой стадии становится более 60.

Клетки **трофобласта (трофэктодермы)** начинают активно синтезировать гормон — хориальный гонадотропин (тест на беременность!), а также различные лизирующие ферменты. Они приобретают инвазивные свойства, обеспечивая **гистиотрофное** питание зародыша и процесс имплантации.

Клетки ВКМ активно размножаются и при дальнейшем развитии дают начало всем тканям собственно эмбриона, а также его внезародышевым частям (хорион, плацента, желточный мешок, аллантаис, амнион).

В ходе дробления зародыш продвигается по маточной трубе в направлении матки как за счет тока жидкости, так вследствие перистальтических сокращений мускулатуры и движения эпителиальных ресничек. На 5–6-й день зародыш на стадии бластоцисты попадает в матку.

В заключение отметим, что первые деления дробления осуществляются за счет генетической информации, накопленной ооцитом еще в период оогенеза. *Зародыш человека обладает достаточным запасом готовых белков, рибонуклеопротеиновых комплексов, необходимых для синтеза новых белков, а также питательных веществ и энергетических ресурсов, чтобы полностью обеспечить начальные этапы эмбриогенеза.* Синтез белков, необходимых на этой стадии, происходит на матрицах РНК, синтезированных еще в оогенезе, т.е. на хромосомах ооцита. Отсюда ее название **материнская РНК**. Переключение индивидуальной генетической программы с материнской РНК на геном самого зародыша происходит постепенно. Считается, что у зародыша человека этот процесс начинается только со стадии 4–8 бластомеров, т.е. несколько позже, чем у лабораторных мышей (2 бластомера).

2.4. ИМПЛАНТАЦИЯ И РАННЕЕ ПОСТИМПЛАНТАЦИОННОЕ РАЗВИТИЕ (7–20 д.р./3–4 н.б.)

Зародыши человека во время имплантации и в течение раннего постимплантационного периода по многим причи-

нам мало доступны для прямого исследования. Отчасти это обусловлено тем, что в большинстве случаев женщина еще не осведомлена о наличии беременности. Отсутствуют безопасные для плода инвазивные методы прижизненного получения материала, а материал медицинских абортв крайне редко пригоден для морфологических исследований. Возможности прямого ультразвукового сканирования, даже с использованием УЗ аппаратов высокого разрешения, не позволяют исследовать тонкую морфологию развивающегося зародыша ввиду его небольших размеров. Поэтому приведенные сведения основаны, главным образом, на результатах изучения уникальных случаев, данных сравнительной эмбриологии высших приматов и прямых визуальных наблюдениях, выполненных с помощью УЗ аппарата уже в раннем постимплантационном периоде.

Достигнув матки, зародыш выходит из блестящей оболочки. Процесс «вылупления» (называемый также «хэтчингом») происходит за счет активного движения (пульсации) самого зародыша, так и за счет действия литических ферментов, выделяемых клетками трофэктодермы (рис. 2.4, 8). К моменту имплантации набухшая слизистая матки находится в фазе секреции: эпителий маточных желез выделяет гликоген, муцин, сиаловые кислоты, гистамин. Сильно развит децидуальный слой эндометрия, особенно в месте имплантации зародыша. Клетки трофобласта вступают в непосредственный контакт с клетками слизистой оболочки матки и с помощью литических ферментов разрушают вначале эпителий, а затем и несколько подлежащих слоев децидуальных клеток (рис. 2.6). Постепенно зародыш оказывается полностью погруженным в эндометрий стенки матки. Такой тип имплантации называется **интерстициальным**. *Продолжительность имплантации у человека от момента прикрепления плодного яйца к стенке матки до его полного погружения в эндометрий составляет около 40 ч.*

Сам процесс имплантации требует строгой синхронизации программы развития зародыша и стенки матки, регулируемой с помощью половых гормонов. Любые нарушения в самом зародыше или связанные с дефектами эндометрия, а также с десинхронизацией ритмов развития зародыша и стенки матки неминуемо ведут к нарушению имплантации и прерыванию беременности. Последнее может наступать

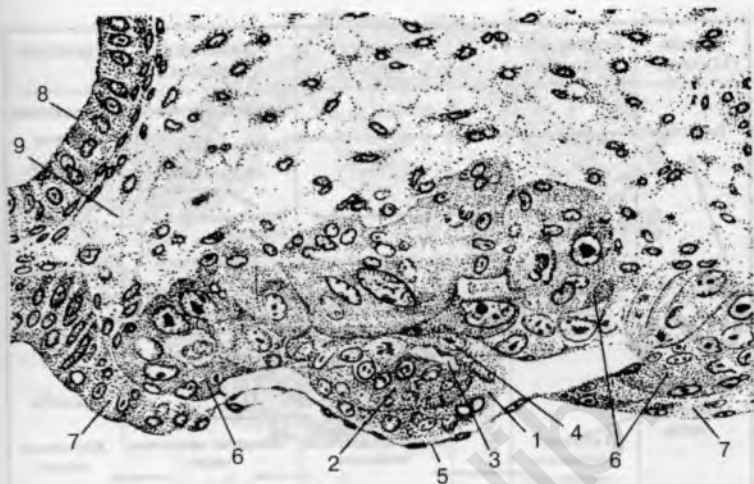


Рис. 2.6. Имплантирующаяся бластоциста человека. 7,5 суток внутриутробного развития (по Гертигу и Рокку, 1945):

1 – энтодерма, 2 – наружный слой зародышевого щитка (первичная эктодерма), 3 – амниотическая полость, 4 – трофэктодерма, 5 – внезародышевая энтодерма, 6 – разрастающийся трофобласт в слизистой матки, 7 – регенерирующий эпителий матки, 8 – маточная крипта, 9 – соединительная ткань матки.

столь рано, что зачастую не улавливается даже самой женщиной. Не случайно именно с процессом имплантации, согласно теории известного отечественного эмбриолога профессора П.Г.Светлова, связывают **первый критический период** развития зародыша человека (Светлов П.Г., 1960).

Для эмбриогенеза человека характерно очень раннее обособление провизорных органов. Уже во время имплантации возникает внезародышевая мезодерма, выстилающая полость **бластоцисты** и участвующая в образовании **хориона**. Многочисленные ворсинки хориона покрывают поверхность плодного яйца и глубоко проникают в толщу стенки, разрушая сосуды эндометрия. Это ведет к появлению лакун с материнской кровью, в которых плавают трофобластические тяжи, образующие **первичные ворсинки**. С их появлением зародыш называют **плодным пузырем**. Вростание в трофобластические тяжи внезародышевой мезодермы приводит к образованию **вторичных ворсин** (13–14-й д.р.) (см. рис. 2.14). Клетки наруж-

| Морула (32 клетки) | Бластоциста (64 клетки) | | 2-слойный эмбрион | 3-слойный эмбрион | Структуры |
|----------------------------|---------------------------------|-----------------|--|---|--|
| Трофобласт | | | | Синцитиотрофобласт Цитотрофобласт Мезодермальна строма | Ворсинчатый хорин/ плацента |
| Морула | Эпибласт (первичная эктодерма) | Импла нтация | Эмбриональная эктодерма Эмбриональная эктодерма | Эмбриональная эктодерма Эмбриональная мезодерма Эмбриональная энтодерма | Хорин Зародыш (зачатки всех органов и тканей) |
| Внутренняя клеточная масса | Гипобласт (первичная энтодерма) | | Амниотическая эктодерма Экстраэмбриональная энтодерма | Энтодерма желточного мешка | Амнион Желточный мешок |
| 60 час | 96 час | 5 сут. | 7–13 сут. | с 14 сут. и позже | |

Рис. 2.7. Схема развития и дифференцировки эмбриона человека на ранних стадиях развития (по Crane, Cheung, 1988; Дыбан, 1988).

ного слоя трофобласта образуют синцитий, а внутренний слой – представлен камбиальными клетками цитотрофобласта (клетки Лангханса). Именно эти клетки, длительное время сохраняющие митотическую активность, используются для цитогенетического анализа при необходимости кариотипирования зародыша (см. главу X).

Таким образом, у человека развитие хориона существенно опережает развитие производных эмбриобласта. Более того, до определенной степени оно происходит автономно, т.е. не зависит от развития самого зародыша. Хорошо известно, что ворсинки хориона могут оставаться в матке жизнеспособными в течение нескольких недель после резорбции самого зародыша (Дыбан А.П., 1959). Именно на таких абортивных плодных пузырях («blighted ova»), зачастую лишенных зародышей или содержащих их мацерированные остатки, до недавнего времени и была получена вся основная информация о влиянии хромосомного дисбаланса на эмбриогенез человека. Это тем более прискорбно, что на этих стадиях развития дефекты наследственного аппарата, в том числе и хромосомные aberrации, проявляются особенно часто и приводят

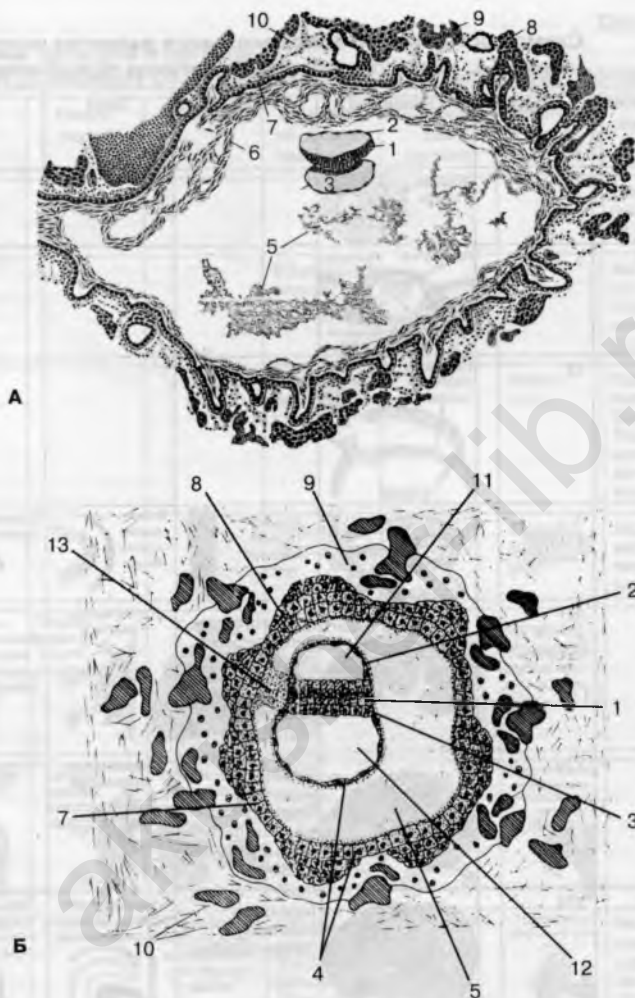


Рис. 2.8. Имплантирующий зародыш человека 14-го (А) и 15-го дней развития (Б) (по Кнорре, 1967):

1 – первичная эктодерма (наружный слой зародышевого щитка, дно амниотической полости), 2 – эктодерма амниона, 3 – эмбриональная энтодерма (внутренний слой зародышевого щитка, крыша желточного мешка), 4 – желточная энтодерма, 5 – экзоцелом, 6 – внезародышевая мезодерма, 7, 8 – цитотрофобласт, 9 – плазмодиотрофобласт, 10 – лакуны с материнской кровью, 11 – амниотическая полость, 12 – полость желточного мешка; 13 – амниотическая ножка (зачаток аллантаоиса).

**Схема постадийного эмбрионального развития человека,
(Jones K.L. «Smith's recognizable patterns of malformation»)**

























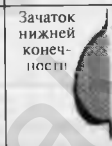
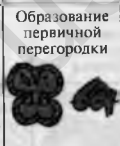

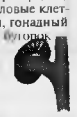


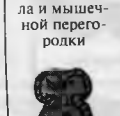




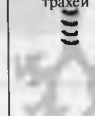
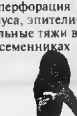
| Срок, дни | Длина, мм | Стадия | Общий вид | ЦНС | Глаза | Уши |
|-----------|-----------|----------------------|---|--|---|---|
| 4 | | 3 | Бластоциста  | | | |
| 7-12 | 0,1 | 5 | Эктодерма Амнион Эндодерма Желточный мешок  | | | |
| 19 | 1 | IX | Передняя головная складка Сердце  | | | |
| 24 | 2 | X Ранние сомиты | Кишка Аллантоис  | Инвагинация нервной трубки  | Формирование глазного яблока  | Слуховая плакода  |
| 30 | 4 | XII 21-29 сомитов |  | Закрытие нервной трубки Ромбоцефалон Мезенцефалон Прозенцефалон Ганглии V, VII, VIII, X | Оптическая чашечка  | Инвагинация слуховой плакоды  |
| 34 | 7 | XIV |  | Зачаток мозжечка Формирование мезенцефального и шейного изгибов | Инвагинация хрусталика  | Слуховой пузырек  |
| 38 | 11 | XVI |  | Базальная пластина Нейрогипофиз | Отделение хрусталика, пигментация сетчатки  | Эндолимфатический мешок, наружный слуховой проход  |
| 44 | 17 | XVIII |  | Обонятельные луковички Полушария головного мозга | Волокна хрусталика, миграция клеток сетчатки Гиалоидные сосуды  |  |

Таблица 2.3

дельных зачатков и органов

th ed. W.B.Saunders Co, Philadelphia, London, Toronto 1997, 857p)

| Лицо | Конечности | Сердце | Желудочно-кишечный тракт | Дыхательная система | Мочеполовая система | Другое |
|---|---|---|---|---|--|--|
| | | | | | | Бластоциста, состоящая из 58 клеток |
| | | | Желточный мешок | | | Амнион Ангиобласты Хорионический гонадотропин |
| | | | Первичный рот клоака | | Аллантоис | Первичная полоска Хорда Первичные клетки крови в желточном мешке |
| | | | Первичная кишка | | Мезонефральный мост | Желточный мешок больше, чем амниотический |
| Жабрные дуги  | Зачаток верхней конечности  |  | Открытие ротовой щели Печень Желчный пузырь | Легочный ствол  | Мезонефральный поток входит в клоаку | |
| Блажные плакаты  | Зачаток нижней конечности  | Образование первичной перегородки  | Полость глотки Щитовидная и парашитовидная железы Желудок | Бронхи  | Уроректальная перегородка, половые клетки, гонадный поток  | |
| Осевые ходы  | Формирование кисти  | Формирование А-В канала и мышечной перегородки  | Слепая кишка Желчный пузырь Печеночные протоки Селезенка | Главные доли  | Парамезонефральный проток  Врастание целомиического эпителия (формирование гонад) | Мозговое вещество и кора надпочечников Лимфатическая система |
| Образование хоан и неба  | Формирование пальцевых лучей и локтевого сгиба  | Аорта Легочная артерия Мембранные перегородки | Проток 12-перстной кишки закрыт Аппендикс | Формирование хрящей и трахей  | Формирование уроректальной перегородки, перфорация ануса, эпителиальные тяжи в семенниках  | Первичные мышцы |










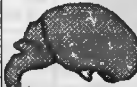








| Срок, дни | Длина, мм | Стадия | Общий вид | ЦНС | Глаза | Уши |
|-----------|-----------|--------|---|---|---|--|
| 52 | 23 | XX |  | Глазной нерв | Роговица |  |
| 55 | 28 | XXI |  | | Веки | Улитка Слуховой нерва |
| 7,5 нед. | | |  | Полушария мозга  Воронка | Установка хрусталика на место локализации | |
| 8 нед. | | |  | Примитивная кора  Обонятельные доли, твердая и мягкая мозговые оболочки | Веки Ушные каналы | |
| 10 нед. | | | | Спинальный мозг  Мозжечок | Радужка Цилиарное тело Слезные железы | |
| 12 нед. | | |  | Шейное и поясничное утолщение спинного мозга, конский хвост  | Сетчатка Формирование оси зрения | |

Таблица 2.3 (окончание)

| Лицо | Конечности | Сердечно-сосудистая система | Желудочно-кишечный тракт | Дыхательная система | Мочеполовая система | Другое |
|---|--|--|--------------------------|--|--|------------------------|
| | Исчезновение хрящевых перегородок  | Образование вторичной перегородки  | | | Соединение собирательных трубочек и клубочков | |
| | Формирование плечевой кости  | | | | Гломерулярный аппарат Тестикулы, интерстициальные клетки | Сосуды головного мозга |
| Твердое небо  | | | | | | |
| Дентальная пластинка | | | | | | |
| Подъязычная железа  | | | |  | | |
| Губы, хрящи носа Челюстная кость  | | | | | | |
| Сосочки языка щęki  | | Кровеносные сосуды | | Коллагеновые волокна | | |
| Зубные сосочки | | | | | | |

к массовой гибели зародышей, которая нередко воспринимается самими женщинами как нарушение ритма менструального цикла.

Во время имплантации и раннего постимплантационного периода происходят кардинальные события и в самом зародыше. Этапы развития зародыша человека и пути дифференцировки эмбриональных тканей на ранних стадиях развития приведены на схеме (см. рис. 2.7). Путем **деламинации (расслоения) внутренней клеточной массы на эктодерму и энтодерму** вначале образуется двухслойный, а затем, после формирования **первичной полоски и Гензеновского узелка**, и трехслойный (появляется **зародышевая мезодерма**) зародыш, возникает **желточный мешок и амнион**, соответственно появляются амниотическая полость и полость желточного мешка (см. рис. 2.8, А). Из заднего конца крыши желточного мешка вырастает в амниотическую ножку продолговатый, слепо оканчивающийся вырост — **аллантаис**. Вместе с окружающей его **мезенхимой** и растающими на более поздних стадиях эмбриогенеза сосудами он принимает участие в формировании пуповины. Зародыши человека во время имплантации показаны на рисунке 2.8 (Б).

На 9–14-е сутки зародыш человека представлен мощно развитыми внезародышевыми частями (трофобласт, внезародышевая мезенхима, амнион, желточный мешок, амниотическая ножка) и лишь его ничтожная часть (дно амниотического пузыря и крыша желточного пузырька) представляет собой материал, из которого позднее формируется тело зародыша. Основные морфологические характеристики зародыша человека в течение проэмбрионального периода развития приведены в таблице 2.1. Отметим, что согласно классическим данным Института Карнеги, дополненным исследованиями чешского эмбриолога Ю.Ярасика (Jirasek J.E., 1985), формирование **первичной полоски** происходит на 15–17-й д.р. Главный осевой орган будущего скелета — **хорда**, закладывается на 17–20-й д.р., тогда же возникает и зачаток будущей центральной нервной системы — **нервная пластинка**.

2.5. ПЕРИОД РАННЕГО (АКТИВНОГО) И ПОЗДНЕГО ОРГАНОГЕНЕЗА (20–60 д.р./5–12 н.б.)

Согласно понятиям классической эмбриологии начало этого периода соответствует стадии нейруляции, т.е. появле-

нию нервной пластинки и закладке осевого комплекса органов («горизонт» IX по Стритеру). В это время происходят: обособление тела зародыша от его внезародышевых частей (1), образование **нервных валиков** и их смыкание в **нервную трубку** (2), появляются первые **сомиты**, начинается сегментация и дифференцировка осевой мезодермы (3) (рис. 2.9, 2.12). Подробно эти сложные морфогенетические процессы рассмотрены в специальных монографиях и обзорах по эмбриологии и тератологии человека (Кнорре А.Г., 1967; Бодемар Ч., 1971; Jirasek J.E., 1985; Shepard Th.H., 1998).

Копчиково-теменные размеры зародыша в течение этого периода увеличиваются от 1,5–2 до 30–40 мм. Временные параметры появления различных органов и некоторые их характеристики приведены в таблице 2.1. Внешний вид зародышей человека на последовательных стадиях развития согласно классификации Карнеги приведен на рисунке 2.10 (А, Б, В, Г).

Четкими критериями начала этого периода являются появление первых сомитов и нервного желобка, выявляемых с помощью УЗ аппарата. Уже на X стадии развития (21–26-й дни после овуляции/5–6-я н.б.) определяются 1–12 пар сомитов. Их число быстро нарастает и уже к XII стадии (28–32-й д.р./6–8-я н.б.) достигает 21–29 пар. Размеры плодного яйца составляют 3–5 мм. К 30-му дню насчитывается 30 пар сомитов, а у 7–8-недельного зародыша их становится 43–44 пары. В среднем, в сутки прибавляется по 2–3 сомита. Сегментация (метамеризация) сомитов происходит постепенно, в направлении спереди – назад, начиная с 3-й пары. Решающая роль в процессах сегментации и возникновении первичной метамерии тела принадлежит особому семейству генов – **генов факторов транскрипции**, получивших название **гомеобоксных генов** (Корочкин Л.И., 2002). Из центральных крупных частей сомитов – миотомов – развивается вся скелетная мускулатура тела, тогда как из их более рыхлых парных периферических участков – боковых пластинок (**спланхнотомов**) – зачатки канальцев первичной (нефротомы), а также вторичной почки, эпителиальные выстилки брюшной, плевральной и перикардальной полостей, вся гладкая мускулатура и зачаток сердца. Из других частей сомитов – **склеротома** (медиовентральная часть) и **дерматома** (дорсо-латеральная часть) развиваются, соответственно, осевой скелет и кожа (рис. 2.9).

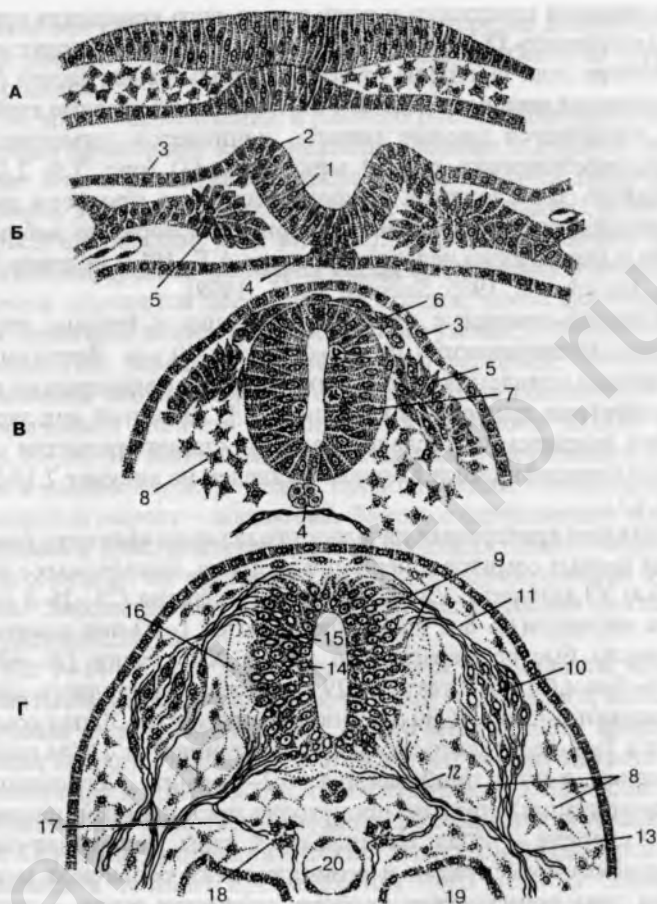


Рис. 2.9. Последовательные поперечные срезы зародышей человека на 8-й (А, Б), IX (В) и X (Г) стадиях развития. Формирование и дифференцировка нервной трубки и ганглиозной пластинки (по Кнорре, 1967). А — нервный желобок и нервные валики; Б — замыкание желобка в трубку и срастание нервных валиков; В — нервная трубка, ганглиозная пластинка с выселяющимися клетками; Г — начало дифференцировки спинного мозга и формирования спинальных ганглиев:

1 — нервный желобок; 2 — нервные валики; 3 — кожная эктодерма; 4 — хорда; 5 — мезодерма (сомиты); 6 — ганглиозная пластинка; 7 — нервная трубка; 8 — мезенхима; 9 — зачаток спинного мозга; 10 — зачаток спинального ганглия; 11, 12 — корешки спинномозговых нервов, 13 — аорта; 14 — целом.

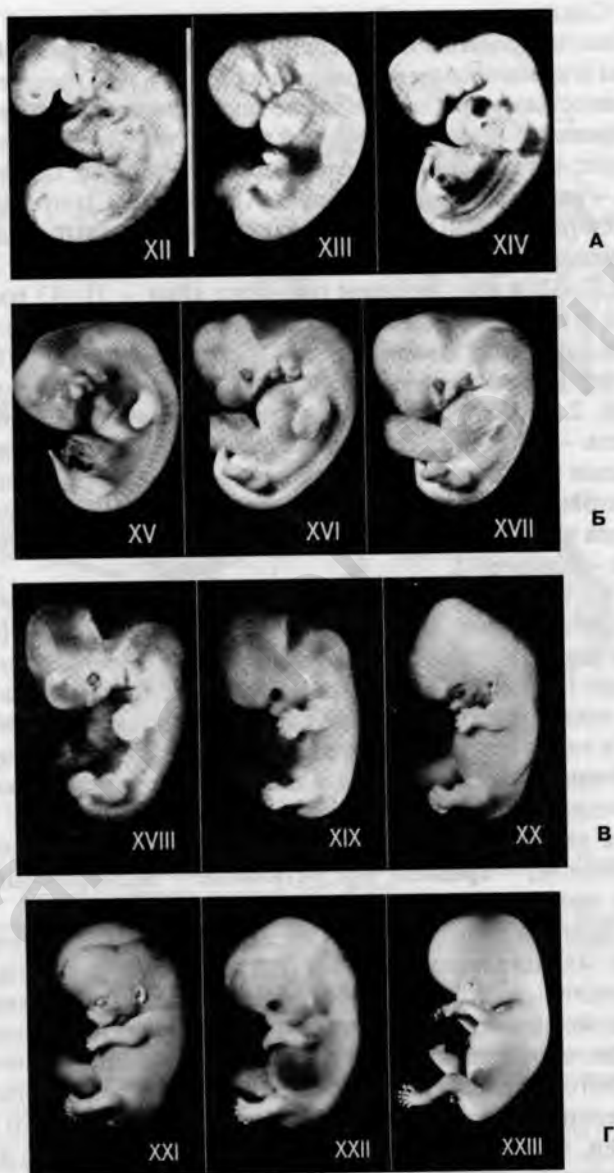


Рис. 2.10. Внешний вид зародышей человека на XII–XIV (А), XV–XVII (Б), XVIII–XX (В) и XXI–XXIII (Г) стадиях развития по классификации Карнеги (описание в тексте).

Смыкание нервной трубки начинается в будущей шейной области зародыша и постепенно распространяется в каудальном и краниальном направлениях. На 6-й н.б. нервная трубка полностью закрыта. Уже после закрытия переднего и заднего **нейропоров (отверстий нервной трубки)** ее головной конец образует расширения, отделенные друг от друга перегородками – **мозговые пузыри**. Вначале (XI горизонт Стритера) их три, затем передний и задний подразделяются каждый на два. Возникают 5 мозговых пузырей (XIV горизонт Стритера, 35–38-й д.р./9–10-я н.б., размеры плодного яйца – 11–13 мм). Первый из них дает начало большому (конечному) мозгу, второй – промежуточному, третий – среднему, четвертый – мозжечку и варолиевому мосту, пятый – продолговатому мозгу (рис. 2.11). Второй мозговой пузырь образует два парных выроста – зачатки глаз. Глазные пузыри появляются уже на XI стадии развития (табл. 2.1). Важная роль в дифференцировке мозговых пузырей и в дальнейшем становлении и развитии мозга и черепа принадлежит другой группе гомеобоксных генов – **генам SOX**.

На той же XI стадии в области промежуточного мозга возникают парные впячивания – **слуховые плакоды** (зачатки внутреннего уха). По бокам задней части головы и шеи зародыша так же в виде парных впячиваний эктодермы возникают последовательно четыре пары **жаберных щелей**. Навстречу им в виде выпячиваний стенки передней кишки образуются 4 **жаберных кармана**. Прорыва жаберных карманов в соответствующие им жаберные щели у человека не происходит. Первая пара дает начало **наружному уху**, вторая (вместе с жаберным карманом) – **среднему уху**, остальные – **эндокринным железам: тимусу, щитовидной и паращитовидной железам**.

Важным событием в начале активного органогенеза является закладка магистральных сосудов и зачатка сердца. Сердце закладывается вначале как два крупных магистральных сосуда, которые затем сливаются, образуя единую трубку эндокарда, окруженную более толстым слоем миокарда – производного висцерального листка спланхнотомы и зародышевой мезенхимы. Сокращения сердца наступают еще до его иннервации, т.е. способность к сокращению и проведению импульса присуща самой мезодерме. Первые сердцебиения регистрируются уже на 6-й н.б., точнее на стадии, соответствующей X «горизонту Стритера» (21–26-й д.р./5–6-я н.б., размеры

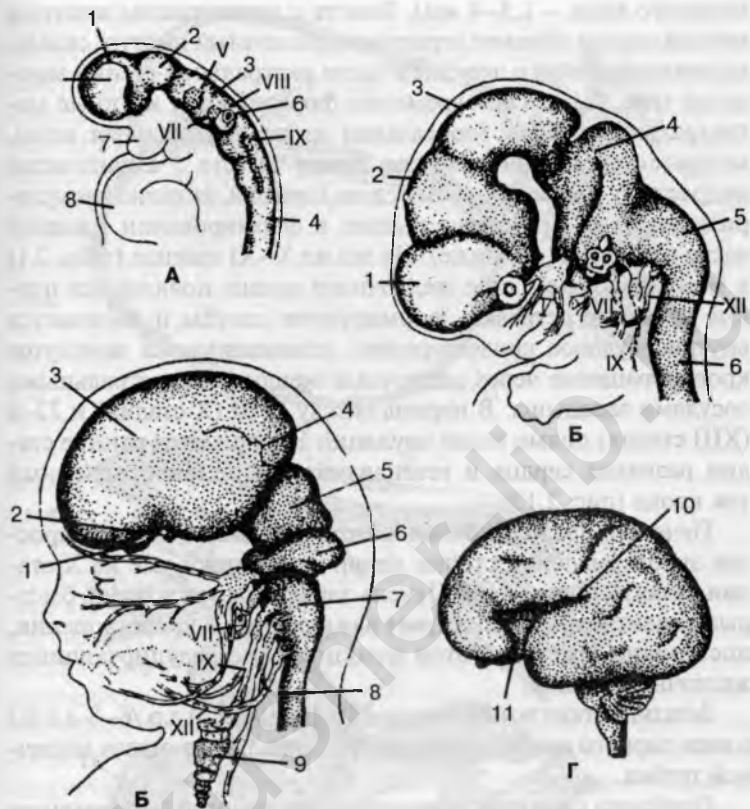


Рис. 2.11. Последовательные стадии развития головного мозга (по Пэттену, 1959). А – Стадия 3 мозговых пузырей (XII–XIII):

1 – prosencephalon; 2 – mesencephalon; 3 – rhombencephalon; 4 – спинной мозг; 5 – глазной пузырь; 6 – слуховая ямка; 7 – нижнечелюстной отросток; 8 – сердце; V, VII, VIII, IX – черепно-мозговые нервы.

Б – Стадия 5 мозговых пузырей:

1 – telencephalon; 2 – diencephalon; 3 – mesencephalon; 4 – metencephalon; 5 – myelencephalon; 6 – спинной мозг; V, VII, IX, X, XII – черепно-мозговые нервы.

В и Г – Формирование дефинитивных отношений отделов головного мозга (фетальный период):

1 – обонятельная доля; 2 – перекрест зрительных нервов (chiasma opticus); 3 – полушария большого мозга; 4 – контур промежуточного мозга; 5 – средний мозг; 6 – мозжечок; 7 – продолговатый мозг; 8 – спинной мозг; 9 – гортань; 10 – силвиева борозда; 11 – рейлиев островок на дне силвиевой ямки; VII, IX, XII – черепно-мозговые нервы.

плодного яйца — 1,5—4 мм). Вместе с прилежащим зачатком печени сердце образует сердечно-печеночный выступ, сильно выпячивающийся в передней части вентральной стенки зародыша (рис. 2.12). Одновременно формируются крупные магистральные сосуды (дорсальная аорта, кардиальная вена), которые через **амниотическую ножку** вместе с аллантоисом подрастают к мезенхимному слою хориона, активно васкуляризируют его, принимая участие в формировании плодной части плаценты (см. ниже). На тех же X—XI стадиях (табл. 2.1) в мезодермальном слое желточного мешка появляются первые **кровяные островки**, формируются сосуды и начинается внутрисосудовое кроветворение; устанавливается замкнутое кровообращение через желточный мешок с магистральными сосудами зародыша. В период между 21-м (X стадия) и 32-м (XIII стадия) днями после овуляции завершаются ранние стадии развития сердца и устанавливается однонаправленный ток крови (рис. 2.13).

Печень и поджелудочная железа возникают в виде выростов энтодермальной стенки первичной кишки уже на X стадии развития (рис. 2.12). Печень характеризуется очень быстрым развитием, так как играет важную роль в кроветворении, постепенно замещая в этой функции рано редуцирующийся желточный мешок.

Зачатки легких возникают на XII стадии (28-й д.р./6—8-я н.б.) в виде парного выпячивания вентро-каудального отдела кишечной трубки.

Особенно сложный, многоэтапный процесс эмбриогенеза претерпевает почка. На X стадии она закладывается в виде рудиментарной (нефункционирующей) предпочки (*pronephros*) с ее отводящим протоком — мюллеровым каналом (зачаток матки и маточных труб) (Кнорре А.Г., 1967; 1971).

На стадии XI возникает первичная почка (*mesonephros* или Вольфово тело), функционирующая как орган выделения в течение антенатального периода. Развиваясь из нефротомов сомитов (см. выше), первичная почка сохраняет метамерное строение. Ее отводящий проток — вольфов канал, впоследствии трансформируется в семявыносящие протоки. Вольфовы и мюллеровы каналы открываются в клоаку независимыми друг от друга отверстиями. При этом вольфовы каналы остаются раздельными, а отходящие от них в области клоаки слепые отростки дают начало мочеточникам и лоханкам (см. ни-

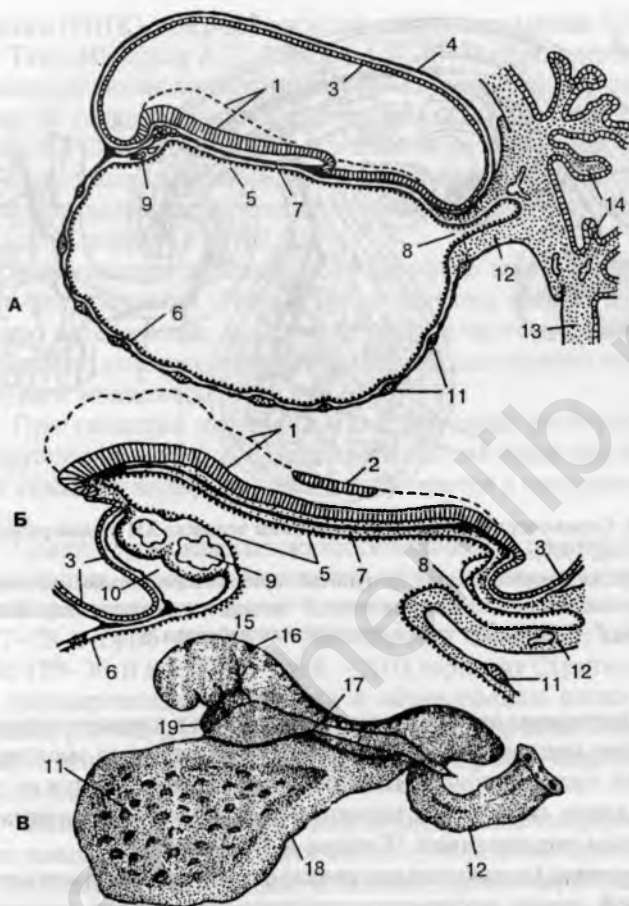


Рис. 2.12. Схема обособления зародыша от внезародышевых частей (А – стадия – 8; Б – стадия IX) и ранних этапов формирования сердечно-сосудистой системы (В – стадия XI). Сагитальные срезы, хорион и амнион удалены (по Кнорре, 1967):

1 – кожная эктодерма; 2 – нервные валики; 3 – эктодерма амниона; 4 – мезодерма амниона; 5 – кишечная энтодерма; 6 – желточная энтодерма; 7 – хорда; 8 – аллантаис; 9 – эндотелиальный зачаток сердца; 10 – перикардальная полость; 11 – кровяные островки в стенке желточного мешка; 12 – амниотическая ножка; 13 – хориальная пластинка; 14 – ворсинка хориона; 15 – мандибулярные жаберные дуги; 16 – слуховая ямка; 17 – амнион; 18 – желточный мешок; 19 – сердечный выступ.

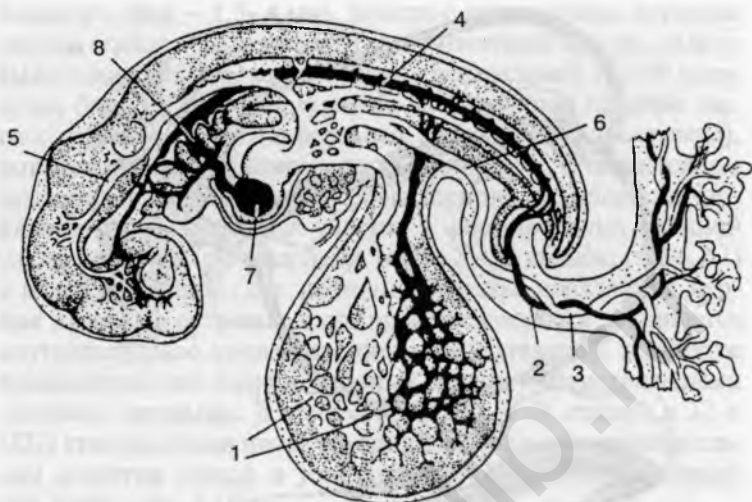


Рис. 2.13. Схема сосудистой системы зародыша человека XII стадии развития (по Пэттену, 1959):

1 — сосуды желточного мешка; 2 — пупочная артерия в амниотической ножке; 3 — пупочная вена; 4 — дорсальная аорта; 5 — передняя, 6 — задняя кардинальные вены; 7 — сердце; 8 — третья артериальная жаберная дуга.

же). Мюллеровы протоки в месте впадения в клоаку сливаются в один непарный канал. При этом изначально мюллеров канал не связан с почечными канальцами, т.е. не служит для оттока мочи, поэтому на переднем своем конце он начинается слепым расширением (Кнорре А.Г., 1967; 1971).

Вторичная (окончательная почка) формируется из метанефрогенной ткани несегментированных каудальных участков нефротомов (см. выше), в которой уже на XII стадии (28-й д.р./6–8-я н.б.) дифференцируются почечные канальцы, вступающие одним концом в тесный контакт с врастающими в зачаток почечными артериями. Так возникают **мальпигиевы тельца** (клубочки). Другим концом они соединяются с парными отростками вольфовых каналов, образующими мочеточники и лоханки.

Зачатки гонад возникают в виде парных валиков овальной формы на медиальной стороне вольфовых тел (первичных почек). Вначале (X–XI стадии) они не дифференцированы, однако, после того как их достигают первичные половые

клетки (ППК), мигрирующие из желточного мешка (Семенова-Тянь-Шанская А.Г., Кнорре А.Г., 1972), начинается выраженной половая дифференцировка зачатков гонад, определяемая на гистологических препаратах с XIV–XV стадий развития (35–43-й д.р./8–10-я н.б.). Важная роль в развитии внутренних половых органов, а впоследствии и наружных гениталий принадлежит производным вольфовых и мюллеровых каналов (Кнорре А.Г., 1967; 1971).

У зародышей женского пола вольфово тело и вольфов канал редуцируются. Напротив, мюллеровы каналы прогрессивно развиваются, причем его парные части становятся яйцеводами, непарный каудальный отдел дает начало эпителию матки и влагалища.

При развитии зародыша мужского пола, наоборот, редуцируются производные мюллера канала, тогда как вольфовы каналы и вольфовы тела преобразуются в семявыносящие пути.

Среди других важных морфогенетических процессов, происходящих в период активного органогенеза, следует отметить образование почек конечностей. Сначала передних (27–28-й д.р./6–8-я н.б. – XII горизонт Стритера), затем задних (29–30-й д.р./8–10-я н.б. – XIII горизонт Стритера), рост и формирование кишечника с образованием естественной грыжи (37–42-й д.р./11–12-я н.б. – XVI горизонт Стритера), формирование глаз и уха, лицевого черепа, твердого неба и пр. (табл. 2.1).

Важнейшим событием этого периода является формирование плаценты. Процесс начинается с 3-й недели беременности и характеризуется бурным развитием ворсин хориона в месте врастания через амниотическую ножку (будущую пуповину) сосудов плода в мезенхимную часть хориальной оболочки. В формировании сосудистой сети плаценты принимают также участие сосуды, возникающие непосредственно за счет размножения и дифференцировки ангиобластов в мезенхиме хориона. При соединении пупочных сосудов с сосудистой сетью ангиобластов устанавливается плодово-плацентарный кровоток. Кровеносные сосуды врастают в соединительно-тканый остов вторичных ворсинок хориона (рис. 2.14), превращая их таким образом в **дефинитивные третичные ворсинки** (5–7-я н.б.). В области формирования плаценты (участок стенки матки между зародышевым пузырем и миометрием – decidua basalis)

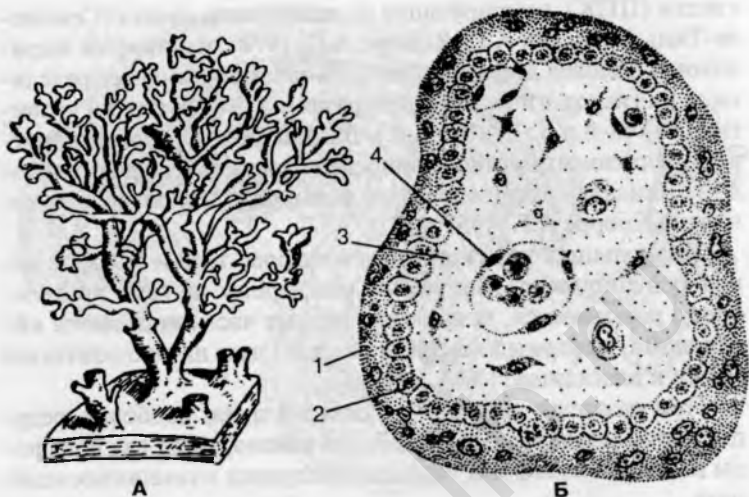


Рис. 2.14. Общий вид (А) и поперечный срез (Б) дефинитивной (третичной) ворсинки хориона плода человека XX стадии развития:

1 – плазмодиотрофобласт (синцитиотрофобласт); 2 – цитотрофобласт; 3 – соединительная ткань; 4 – кровеносный сосуд.

ворсинки хориона растут особенно сильно, активно ветвятся. Синцитий ворсин омывается материнской кровью, изливающейся в межворсинчатое пространство из спиральных артерий и кровеносных лакун эндометрия. Схема строения плаценты человека приведена на рисунке 2.15. Сильно утолщенная *decidua basalis*, пронизанная ворсинками хориона, образует плодную часть дефинитивной хорио-аллантаидной плаценты. Именно в области формирующейся плаценты пролиферативная активность клеток цитотрофобласта ворсин хориона особенно высока и именно такие ворсины особенно информативны для биопсии с целью получения хромосомных препаратов. Напротив, ворсины периферических по отношению к формирующемуся плацентарному диску частей хориона, прилежащих к области париетальной маточной стенки (*decidua parietalis*) уже со 2-го месяца беременности начинают постепенно атрофироваться и практически полностью отмирают к 3-му месяцу беременности (рис. 2.16). С установлением плодово-плацентарного кровотока к концу 13-й н.б. период плацентации заканчивается (Айламазян Э.К., 1998).

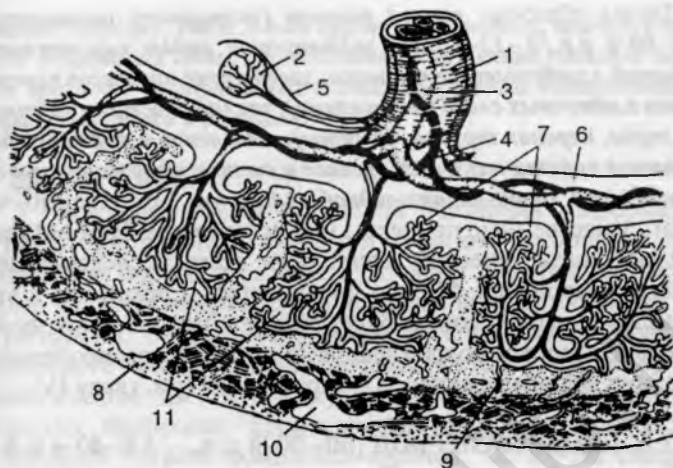


Рис. 2.15. Схема строения плаценты человека (по Кнорре, 1967):

1 – пупочный канатик, 2 – желточный мешок; 3 – пупочная артерия; 4 – пупочная вена; 5 – амнион; 6 – хорион; 7 – ворсинки хориона; 8 – стенка матки; 9, 10 – материнские сосуды (9 – артерии; 10 – вены); 11 – кровеносные лакуны.

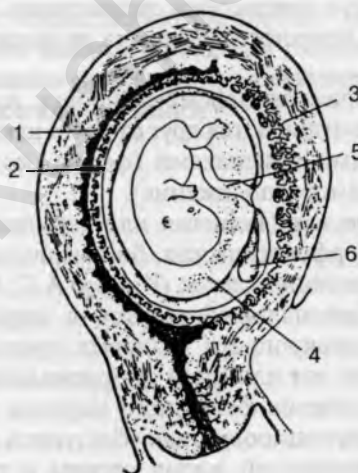


Рис. 2.16. Схема взаимоотношений плода (XVII–XVIII стадии развития) и материнского организма (по Пэттену, 1959):

1 – decidua parietalis; 2 – decidua capsularis; 3 – decidua basalis; 4 – амнион; 5 – пупочный канатик; 6 – желточный мешок.

Таким образом, *период раннего (активного) органогенеза (20–60-й д.р./5–12-я н.б.) знаменуется рядом кардинальных событий в эмбриогенезе человека: завершение процессов перемещения клеточных слоев (нейруляция), закладка осевого комплекса (хорда, нервная трубка, сомиты), выделение и формирование зачатков практически всех органов и систем, формирование дефинитивной хорио-аллантоидной плаценты.* Естественно, что столь существенные процессы морфогенеза требуют адекватной морфогенетической активности всего наследственного аппарата зародыша. Можно предполагать а priori, что в этот период зародыш человека будет обладать повышенной чувствительностью и к повреждающему действию разнообразных внешних вредных факторов – тератогенов (см. главу IV).

2.6. ПЛОДНЫЙ ПЕРИОД (60–80-й д.р. – 13–40-я н.б.)

Без четкой границы события органогенеза, происходящие преимущественно в эмбриональный период, переходят в плодный (фетальный) период, когда основными в морфогенезе становятся процессы гистогенеза (табл. 2.1). Справедливости ради следует отметить, что дифференцировка клеточного и тканевого материала эмбриональных зачатков протекает параллельно с процессами органогенеза. При этом дифференцировка клеточного материала проходит два основных этапа.

1. Неспецифическая дифференцировка, когда клетки различных зачатков отличаются друг от друга какими-то общими морфологическими признаками (форма, количество и тип органоидов, взаиморасположение).

2. Специфическая (тканевая или терминальная) дифференцировка – морфологическая, биохимическая и функциональная специализация клеток (Кнорре А.Г., 1967; 1971).

Каждый эмбриональный зачаток в норме дает начало определенной совокупности тканевых производных. Какие ткани формируют тот или иной эмбриональный зачаток, каким образом в течение фетального периода осуществляется клеточная дифференцировка, как образуются дефинитивные, готовые к постнатальной жизни органы и ткани подробно рассмотрено в прекрасном руководстве по эмбриональному гистогенезу академика А.Г.Кнорре (1971).

Отметим только, что каждый эмбриональный зачаток, сформировавшийся в период органогенеза, имеет свое prospec-

тивное значение, дает много других производных, причем в процессе реализации своих перспективных потенций каждый зачаток проходит свойственные только ему этапы детерминации, дифференцировки и роста.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время накоплена обширная информация о проэмбриональном и внутриутробном (эмбриональном и плодном) периодах развития человека. Вместе с тем, некоторые вопросы эмбриогенеза человека все еще остаются неизученными. В частности, неясен механизм формирования желточного мешка, до конца не выяснен генез первичных половых клеток, достаточно скудна информация о морфогенетических процессах, происходящих в период нейруляции и закладки осевого комплекса органов, т.е. на тех стадиях, когда зародыши человека малодоступны для прямого исследования. Вместе с тем, бурное развитие вспомогательных репродуктивных технологий позволило достаточно детально изучить особенности доимплантационного развития человека. Методы ПД позволяют получать материал плода человека практически на любом сроке беременности (см. главу IX) и, таким образом, существенно расширяют возможности для более детального анализа процессов раннего эмбриогенеза человека с помощью современных молекулярных и цитогенетических методов исследования.

ГЛАВА III. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ПЛОДА

Основные методы, применяемые в ПД наследственных и врожденных болезней, приведены на **рисунке 3.1**. Они могут быть **непрямыми** (объектом исследования является беременная женщина) или **прямыми** (исследуется сам плод). Последние подразделяются на **инвазивные**, когда производится забор плодного материала с целью его последующего анализа при помощи специальных лабораторных методов, и **неинвазивные** (методы ультразвунографии).

3.1. НЕПРЯМЫЕ МЕТОДЫ

Их главная цель — отбор женщин групп высокого риска по рождению детей с ВНЗ, которые требуют углубленных дополнительных исследований, включающих специальные лабораторные (цитогенетические, биохимические, молекулярные) исследования плодного материала.

Непрямые методы позволяют оценить состояние плода по биохимическим показателям в крови и в моче беременной, по результатам акушерско-гинекологического анамнеза. На основании данных бактериологических и серологических исследований можно судить о потенциальной опасности для плода различных инфекционных заболеваний женщины, оценить риск развития Rh-конфликта матери и плода и наметить правильную тактику профилактики гемолитической болезни. **Желательным** для всех беременных и **обязательным** для всех женщин групп высокого риска по ВНЗ у плода (см. главу I) является медико-генетическое консультирование, дополненное, при необходимости, результатами бактериологического, иммунологического и эндокринологического обследований (см. главу V).

Биохимические исследования маркерных сывороточных белков крови беременной (см. главу VII), равно как ультра-

звуковое сканирование (см. главу VIII), в настоящее время рассматривают как обязательные скринирующие программы ПД (см. главу VI), *направленные на выявление женщин групп высокого риска рождения детей с ВПР и наследственными болезнями.*

Помимо тестирования маркерных сывороточных белков в крови матери (биохимический скрининг), медико-генетического консультирования (генетический скрининг) и УЗ исследования с целью выявления пороков развития и УЗ-маркеров хромосомной патологии (УЗ-скрининг) важное место в ПД занимают цитогенетический, молекулярный и иммунологический скрининги. Более подробно скринирующие программы ПД изложены в главе VI, а также в специальных разделах, посвященных биохимическому, ультразвуковому скринингам и медико-генетическому консультированию (главы V, VII, VIII).

3.2. ПРЯМЫЕ МЕТОДЫ

3.2.1. Общая характеристика

Эти методы направлены на исследование самого плода и могут быть *инвазивными* или *неинвазивными* (рис. 3.1). Их высокая разрешающая способность позволяет проводить визуальный осмотр плода, осуществлять забор плодного мате-



Рис. 3.1. Методы оценки состояния плода.

риала и проводить специальные тонкие лабораторные исследования с целью точной диагностики ВНЗ практически на любой стадии внутриутробного развития человека.

Уместно отметить, однако, что на самых ранних стадиях развития, т.е. еще до имплантации, обследование самих эмбрионов, равно как и диагностика генных и хромосомных болезней, возможны только в условиях клиник, работающих по программам экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), в центрах вспомогательных репродуктивных технологий (ЦВРТ). Именно в условиях оплодотворения *in vitro* и культивирования дробящихся зародышей возможно проведение микроманипуляций по извлечению полярных телец и отдельных бластомеров для последующей диагностики хромосомных и генных болезней. Подробно с этими методами можно ознакомиться в серии специальных руководств, методических рекомендаций и монографий (Verlinsky Y., Kuliev A.M., 1993; 2000; Masek M. et al., 2002). Некоторые из этих методов и подходов кратко рассмотрены в главе XIV.

Наименее доступными для ПД являются зародыши периода имплантации. Обычно на этих сроках беременность еще не диагностируется и нередко рассматривается самой женщиной как задержка месячных. Ввиду крайне малых размеров плодного яйца (глава II), его высокой повреждаемости, препятствующей забору плодного материала (1-й критический период по П.Г.Светлову – глава II), ПД на этих сроках не проводится. При необходимости она может быть ограничена только ультразвуковым исследованием (УЗИ) плодного яйца и анализом эмбриональных сывороточных белков в крови беременной женщины (см. главу VII).

подавляющее большинство ПД во всем мире и в России проводится после 10-й недели, преимущественно – во II триместре (15–25-я нед.) беременности. Именно в этот период акушеры-гинекологи выполняют все основные операции по забору плодного материала для последующей ПД (см. главу IX). Вместе с тем, современные тенденции ПД направлены на постепенное смещение времени обращения женщин на ПД со II триместра беременности – на I. По своей эффективности, несомненной акушерской и социальной предпочтительности ПД в I триместре беременности, безусловно, заслуживает всемерной поддержки. Скринирующие программы (непрямые методы) и прямые методы ПД в I триместре беремен-

ности подробно рассмотрены в последующих главах монографии.

В III триместре инвазивная пренатальная диагностика проводится редко. По нашему убеждению, главным показанием к инвазивной ПД в III триместре является необходимость решения вопроса о тактике ведения беременности и родов в зависимости от диагноза у плода.

3.2.2. Прямые методы ПД

3.2.2.1. Неинвазивный метод исследования – ультрасонография

Метод ультрасонографии – является основным и наиболее эффективным прямым неинвазивным методом исследования плода (Юдина Е.В., Медведев М.В., 2002). Быстрое совершенствование УЗ-аппаратов, появление новых диагностических возможностей ультразвукового исследования (3-мерное УЗИ, доплерометрия, коронарография) позволяют в настоящее время выявлять до 80–85% врожденных пороков развития во II триместре беременности (20–22 нед.). *УЗ обследование, безусловно, следует рассматривать как наиболее эффективный современный прямой метод ПД* (см. главу IX, X). Другие неинвазивные прямые методы имеют весьма ограниченное применение (электрокардиография) и скорее представляют исторический интерес (рентгенография). Перспективным для современной ПД представляется использование магнито-резонансного томографа – МРТ. Однако отсутствие убедительных данных о полной безопасности МРТ для развивающегося зародыша человека и высокая стоимость такого исследования сдерживают внедрение этого, безусловно, прогрессивного метода в ПД.

Важно также отметить, что все отклонения в развитии плода, выявляемые с помощью различных прямых неинвазивных методов исследования и, прежде всего, с помощью УЗ, не доказывают наличие хромосомных и тем более генных болезней. Сочетание определенных УЗ-маркеров позволяет в ряде случаев с определенной вероятностью заподозрить тот или иной вариант хромосомной патологии (Снайдерс Р.Дж.М., Николаидес К.Х., 1997; Юдина Е.В., Медведев М.В., 2002). Однако *одного УЗ исследования явно недостаточно для исключения или подтверждения диагноза хромосомной болезни у плода. Более того, отсутствие характерных УЗ-маркеров не является га-*

рантией нормального кариотипа. Поэтому диагностика хромосомных и генных болезней возможна только путем специальных лабораторных исследований материала самого плода.

Такая диагностика проводится при помощи специальных лабораторных исследований образцов материала (биоптатов) самого плода, получаемых различными инвазивными методами (см. главу IX). Метод фетоскопии в связи с наличием высокоразрешающей УЗ-техники в настоящее время имеет скорее историческое значение.

3.2.2.2. Прямые инвазивные методы

3.2.2.2.1. Методы забора плодного материала

Главные из них – хорионбиопсия и плацентобиопсия – получение ворсинок хориона (I и II триместры беременности, соответственно), амниоцентез – получение образцов амниотической жидкости (преимущественно II триместр) и кордоцентез – пункция пуповины с целью получения крови плода (II–III триместры). Выбор инвазивного метода определяется сроком беременности, показаниями к его проведению, инструментальной и методической оснащенностью центра ПД, а также квалификацией акушера-оператора.

Указанные методы внедрены и существенно модифицированы в лаборатории ПД ГУ НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН (см. главу IX). К 2005 г. здесь проведено более 7000 операций, связанных с забором плодного материала на разных сроках беременности, в том числе 2679 хорионбиопсий, 3392 плацентобиопсий, 379 амниоцентезов, 882 кордоцентеза. Риск прерывания беременности в течение 2 нед. после любой из операций, согласно нашим данным, составляет около 0,5%, что соответствует лучшим мировым показателям (см. главу IX).

3.2.2.2.2. Специальные лабораторные методы исследования

Лабораторные методы могут быть различными (см. рис. 3.1). Выбор метода определяется целями и сроками ПД. Наиболее универсальными являются методы цитогенетического анализа и методы молекулярной (ДНК) диагностики.

Цитогенетические методы – методы кариотипирования плода с целью диагностики хромосомных болезней. В настоящее время проблема цитогенетической ПД на любом сроке беременности практически решена. Разработаны надежные и эффективные

методы хромосомного анализа клеток плода и зародышевых оболочек. В зависимости от срока беременности и задач исследования материалом для хромосомного анализа могут служить клетки амниотической жидкости, хориона, плаценты и лимфоциты пуповинной крови плода, полученные тем или иным инвазивным способом. Наиболее часто используются клетки хориона (I триместр) или клетки плаценты (II триместр), полученные с помощью трансабдоминальной хорион- или плацентобиопсии. Все эти клетки имеют плодное происхождение и по своим генотипическим характеристикам соответствуют клеткам плода. Хромосомные препараты из тканей хориона или плаценты готовятся прямым или косвенным методами (Баранов В.С. и др., 1995; Кузнецова Т.В. и др., 1999) (см. главу X).

Молекулярные (ДНК) методы применяются для диагностики генных болезней. Они подразделяются на *прямые* (объектом исследования является мутантный ген) и *косвенные* (идентификация мутантного гена проводится с помощью молекулярных маркеров). Для каждого моногенного заболевания разработан свой алгоритм молекулярной диагностики (см. главу XI). Методическую основу молекулярной диагностики большинства генных болезней составляет полимеразная цепная реакция (ПЦР). В настоящее время в России диагностируется свыше 50 различных генных болезней и наследственных синдромов (см. табл. 3.1). Более 12 наиболее частых наследственных болезней (муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна, фенилкетонурия, адреногенитальный синдром и др.) диагностируются в лаборатории ПД ГУ НИИ АГ им. Д.О.Отта РАМН. Эффективность ДНК-диагностики в значительной мере определяется соблюдением ряда требований, которые включают:

- точность клинического диагноза;
- своевременность обследования семьи высокого риска и больного молекулярными методами;
- правильность оценки риска рождения больного ребенка;
- выбор оптимального срока ПД;
- возможность получения материала плода;
- четкость рекомендаций после ПД;
- наличие скринирующих программ ДНК-диагностики.

Эти и другие аспекты ДНК-диагностики, включая алгоритмы ПД наиболее частых моногенных болезней, рассмотрены в главе XI.

Таблица 3.1

**Моногенные болезни, диагностируемые
молекулярными методами в России
(с указанием медицинских диагностических центров)**

| № | Наследственные заболевания | Медицинские центры * |
|----|--|---------------------------|
| 1 | Агаммаглобулинемия | МГНЦ |
| 2 | Адреногенитальный синдром | ИАГ, ГНЦ, МГНЦ, ЦОЗМиР |
| 3 | Альбинизм тип OCA1 | МГНЦ |
| 4 | Альпорта синдром | ГНОКДЦ, МНГЦ |
| 5 | Альфа-1-антитрипсина недостаточность | ИЭМ |
| 6 | Амиотрофия спинальная Верднига–Гоффмана, Кугельберга–Веландера | ИАГ, МГНЦ |
| 7 | Амиотрофия нервальная Шарко–Мари–Тус | МГНЦ, ТИМГ, УНЦ |
| 8 | Амиотрофия спинальная X-сцепленная | МГНЦ |
| 9 | Анжельмана синдром | МГНЦ |
| 10 | Апера синдром | МГНЦ |
| 11 | Атаксия Фридрейха | МГНЦ |
| 12 | Ахондроплазия | МГНЦ |
| 13 | Беквита-Видемана синдром | МГНЦ |
| 14 | Бета-талассемия | ГНЦ |
| 15 | Виллебранда болезнь | ГНЦ, ИАГ |
| 16 | Врожденная контрактурная арахнодактилия | МГНЦ |
| 17 | Врожденная мышечная дистрофия, тип Фукуяма | МГНЦ |
| 18 | Гемофилия А | ГНОКДЦ, ГНЦ, ИАГ |
| 19 | Гемофилия В | ГНОКДЦ, ГНЦ, ИАГ |
| 20 | Гепатолентикулярная дегенерация (болезнь Вильсона–Коновалова) | МГНЦ |
| 21 | Гиперхолестеринемия семейная | ГНОКДЦ, ИЭМ |
| 22 | Гипофизарный нанизм (дефицит гормона роста) | МГНЦ |
| 23 | Гликогенозы | МГНЦ |
| 24 | Глухота нейросенсорная несиндромальная | МГНЦ |
| 25 | Грейга синдром | МГНЦ |

Таблица 3.1 (продолжение)

| № | Наследственные заболевания | Медицинские центры * |
|----|--|-----------------------------------|
| 26 | Дефицит ацил-КоА дегидрогеназы | МГНЦ |
| 27 | Длинного QT синдром | МГНЦ, ТИМГ, УНЦ |
| 28 | Жильбера синдром | МГНЦ |
| 29 | Зонулярная катаракта | МГНЦ |
| 30 | Коффина–Лоури синдром | МГНЦ |
| 31 | Криглера–Найара синдром | МГНЦ |
| 32 | Лимфопролиферативный синдром, X-сцепленный (болезнь Дункана, синдром Пуртильо) | МГНЦ |
| 33 | Лимфидема Минроя | МГНЦ |
| 34 | Луи–Барр синдром (телеангиоэктазия) | МГНЦ |
| 35 | Леша–Нихана синдром | ИАГ |
| 36 | Мартина–Белл (ломкой X-хромосомы) синдром | ИАГ |
| 37 | Марфана синдром | МГНЦ |
| 38 | Миллера–Дакера синдром | МГНЦ |
| 39 | Милроя синдром | МГНЦ |
| 40 | Миодистрофия Дюшенна/Беккера | ГНОКДЦ, ИАГ, МГНЦ, ТИМГ, УНЦ |
| 41 | Миодистрофия Эмери–Дрейфуса | МГНЦ |
| 42 | Миотоническая дистрофия | ИАГ, МГНЦ |
| 43 | Муковисцидоз | ГНОКДЦ, ИАГ, ИЭМ, МГНЦ, ТИМГ, УНЦ |
| 44 | Мукополисахаридозы | МГНЦ |
| 45 | Несиндромальная нейросенсорная тугоухость | МГНЦ, УНЦ, ТИМГ |
| 46 | Ниймегена синдром | МГНЦ |
| 47 | Норри болезнь | МГНЦ |
| 48 | Окулофарингеальная миодистрофия | МГНЦ |
| 49 | Периодическая болезнь | МГНЦ |
| 50 | Псевдоахондропластическая дисплазия | МГНЦ |
| 51 | Прадера–Вилли синдром | ИАГ, МГНЦ |
| 52 | Рецессивный поликистоз почек | МГНЦ |

Таблица 3.1 (окончание)

| № | Наследственные заболевания | Медицинские центры * |
|----|---|------------------------|
| 53 | Ретинобластома | МГНЦ |
| 54 | Смита–Лемли–Опитца синдром | МГНЦ |
| 55 | Спаستическая параплегия Штрюмпеля | МГНЦ |
| 56 | Спино-бульбарная мышечная атрофия (болезнь Кеннеди) | ИАГ, МГНЦ, НИИН |
| 57 | Тестикулярной феминизации синдром | ИАГ, ТИМГ, УНЦ, МГНЦ |
| 58 | Унферрихта–Лундберга болезнь | МГНЦ |
| 59 | Фенилкетонурия | ГНОКДЦ, ГНЦ, ИАГ, МГНЦ |
| 60 | Хантера болезнь | ИАГ |
| 61 | Хольта–Орана синдром | МГНЦ |
| 62 | Хорея Гентингтона | ИАГ, МГНЦ, НИИН |
| 63 | Эктодермальная ангидротическая дисплазия | МГНЦ |
| 64 | Элерса–Данло (классический тип) синдром | МГНЦ |

* ГНОКДЦ – Государственный Новосибирский областной клинико-диагностический центр, Новосибирск;

ГНЦ – Гематологический научный центр МЗ РФ, Москва;

ИАГ – Институт акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта РАМН, Санкт-Петербург;

ИЭМ – Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург;

МГНЦ – Медико-генетический научный центр РАМН, Москва;

НИИН – Научно-исследовательский институт неврологии РАМН, Москва;

ТИМГ – Томский институт медицинской генетики, Томск;

УНЦ – Уфимский научный центр, Уфа;

ЦОЗМиР – Центр охраны здоровья матери и ребенка, Москва.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все существующие методы оценки состояния плода разделяются на прямые (объектом исследования является сам плод) и непрямые (о состоянии плода судят по результатам обследования беременной). Прямые методы включают неинвазивные (ультрасонография) и инвазивные – получение плодного материала на разных стадиях развития с целью последующей диагностики при помощи специальных цитогенетических (хромосомные болезни) и молекулярных (генные болезни) методов исследования. Наиболее эффективным

прямым неинвазивным методом является метод *ультрасонографии* и различные современные модификации этого метода.

Непрямые методы исследования представлены, главным образом, *скринирующими программами*, направленными на выявление женщин групп высокого риска по рождению детей с ВНЗ. Главные из них – *ультразвуковой скрининг, биохимический скрининг, медико-генетическое консультирование*. Любые неинвазивные методы (прямые или непрямые) не позволяют установить точный диагноз наследственного заболевания у плода. Диагноз может быть установлен только на основании результатов прямых цитогенетических и молекулярных исследований материала плода (биоптатов), полученного при помощи различных инвазивных методов (хорионбиопсия, плацентобиопсия, амниоцентез или кордоцентез).

ГЛАВА IV. ОСНОВЫ ТЕРАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА. ТЕРАТОЛОГИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ

4.1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ТЕРАТОЛОГИИ

Тератология – наука о возникновении, диагностике и профилактике врожденных пороков развития (аномалий) (Материалы ВОЗ, 1965). По мировым данным, обобщенным Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ – WHO), видимые при рождении пороки развития (аномалии) определяются примерно у 2,5% всех новорожденных. К 5–6 годам их число возрастает до 7–10% в связи с выявлением отклонений в развитии, не обнаруженных при рождении (Материалы ВОЗ, 1988). Около 44% ВПР имеют множественный характер (Лазюк Г.И., 1991). Это так называемые множественные врожденные пороки развития – МВПР. Следует напомнить, что согласно ставшему классическим определению ВОЗ (1965), *врожденные пороки развития (ВПР) – это стойкие морфологические, биохимические и функциональные нарушения у плода, обусловленные повреждающим действием экзогенных или эндогенных факторов во время беременности* (Материалы ВОЗ, 1965).

Сведения о причинах (этиологии) возникновения ВПР достаточно противоречивы. Проблема заключается в том, что, в силу многоэтапности любого морфогенетического процесса, начинающегося экспрессией определенной группы генов и заканчивающегося формированием соответствующего органа или зачатка, одна и та же аномалия (ВПР) может быть как результатом поломки генетического аппарата (мутаций), так и следствием нарушений процессов морфогенеза на уровне клетки, ткани или органа (Корочкин Л.И., 2002). Следовательно, нарушения морфогенеза могут быть обусловлены повреждающим действием факторов экзогенной природы на эмбрион, т.е. ВПР может быть фенокопией мутаций. Считается, что на долю ВПР, обусловленных на-

следственными факторами (**генные мутации, хромосомные aberrации**) приходится около 5–10% всех ВПР. Примерно столько же составляют ВПР, индуцированные повреждающим (**тератогенным**) действием на плод уже известных экзогенных факторов – **тератогенов**. Наконец, предполагается, что 20% всех ВПР – результат неблагоприятного сочетания экзогенных и эндогенных факторов, т.е. часть ВПР имеет **мультифакториальную природу**. Однако до настоящего времени причины большинства ВПР (около 60%) остаются непонятными и требуют дальнейшего изучения. Все попытки ученых и врачей повлиять на мировые показатели ВПР пока не увенчались успехом. Реальная профилактика ВПР, по-видимому, может быть достигнута только на пути дальнейшего совершенствования всей медико-генетической службы, ее важнейшего и наиболее эффективного звена – пренатальной диагностики (см. главу I).

4.2. ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ТЕРАТОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ

В качестве факторов, определяющих тератогенный эффект, т.е. частоту ВПР, их характер и тяжесть фенотипических проявлений, рассматривают:

- *стадии эмбриогенеза (срок беременности), когда нанесено повреждение;*
- *специфичность повреждающего агента и дозу;*
- *особенности метаболизма;*
- *генотипические особенности матери и плода.*

4.2.1. Стадии эмбриогенеза

Зависимость тератогенного эффекта от стадии эмбриогенеза (срока беременности), когда наносится повреждающее воздействие, четко доказана богатым опытом экспериментальной тератологии. Многочисленные исследования на лабораторных животных, экстраполированные на человека, а также данные клинического акушерства позволили проф. П.Г.Светлову сформулировать ставшую классической *теорию критических периодов развития*, согласно которой в развитии всего плода и его отдельных зачатков существуют короткие периоды повышенной чувствительности к действию повреждающих агентов (Светлов П.Г., 1960). В соответствии с этой теорией *в эмбриогенезе лабораторных млекопитающих и чело-*

века выделяют два основных критических периода: I – период имплантации (бластуляции) и II – период плацентации и активного органогенеза. Именно в эти периоды зародыши особенно чувствительны к повреждающим воздействиям как эндогенной (наследственной), так и экзогенной (тератогены) природы. В отличие, однако, от I критического периода, где доминирующей, как правило, оказывается гибель эмбриона, повреждения, нанесенные во II критическом периоде, обычно реализуются в виде множественных нарушений развития отдельных органов и систем, приводящих к тяжелым анатомическим порокам (МВПР).

Согласно теории П.Г.Светлова, в развитии любого эмбрионального зачатка имеется свой критический период, обычно совпадающий с *периодом детерминации*, во время которого происходят молекулярные события, определяющие перспективную судьбу всего эмбрионального зачатка, после чего наступает период его *дифференцировки*. При этом критические периоды закладки и дифференцировки различных органов и систем не совпадают. Поэтому, в зависимости от стадии эмбрионального развития, природы повреждающего агента, его дозы и длительности действия, характер наблюдаемых аномалий может существенно меняться.

На этом основании были составлены таблицы критических периодов развития отдельных органов и систем зародыша человека; при неблагоприятном воздействии в эти периоды возникают те или иные пороки развития (табл. 4.1) (Новиков П.В., Вельтищев Ю.Е., 2002).

В настоящее время известно, что любому акту морфогенеза действительно предшествует период репрограммирования генома клеток будущего эмбрионального зачатка, и именно этот этап реализации генетической информации, по-видимому, и соответствует критическому периоду морфогенеза того или иного органа (Корочкин Л.И., 2002). В дальнейшем мы еще будем неоднократно возвращаться к проблеме критических периодов. Отметим только, что опыты по химическому тератогенезу далеко не всегда подтверждают теорию критических периодов. Эти несовпадения, скорее всего, отражают высокую специфичность действия химических препаратов на процессы клеточного метаболизма и межклеточного взаимодействия. Поэтому весьма справедливым и практически важным является вывод о том, что *зародыша человека следует*

Таблица 4.1

Критические периоды эмбрионального развития и типичные для них врожденные пороки развития (Новиков П.В., Вельтищев Ю.Е., 2002)

| Критический период (дни развития) | Орган/система | Пороки развития |
|-----------------------------------|------------------------------------|---|
| 21–22 | Невральная трубка | Анэнцефалия, spina bifida |
| 23–25 | Сердце | Крупные врожденные пороки |
| 28–30 | Почки передних конечностей | Амелия |
| 28–30 | Мочевыделительная система | Аплазия, агенезия почек |
| 31–34 | Межжелудочковая перегородка | Дефекты перегородки сердца |
| 35–44 | Слияние складок верхней губы, неба | Расщелина верхней губы и твердого верхнего неба |
| 39–44 | Дифференцировка половых органов | Гермафродитизм |

максимально оберегать от неблагоприятных внешних воздействий и особенно от различных лекарственных препаратов на протяжении всего антенатального периода (Дыбан А.П., 1966).

При неблагоприятных внешних воздействиях (тератогены) или при искажении генетической программы индивидуального развития вследствие мутаций могут возникать нарушения, приводящие не только к видимым аномалиям, но, что особенно важно, к стойким биохимическим или физиологическим отклонениям, существенно нарушающим постнатальное развитие новорожденного. Так, воздействия в плодном периоде могут быть причиной нарушений развития нервной или репродуктивной систем, стойких эндокринных расстройств, т.е. дефектов именно тех органов, процессы терминальной дифференцировки которых сильно растянуты во времени и завершаются только после рождения ребенка. Из этого следует, что развивающийся зародыш человека реально чувствителен к повреждающему действию экзогенных и эндогенных факторов в течение всего антенатального периода развития, хотя конечный результат таких воздействий на разных стадиях эмбриогенеза может быть различным.

Таким образом, суммируя вышеприведенные теоретические положения тератологии как науки, необходимо отметить, что любые повреждающие агенты, в том числе и наиболее сильные, примененные на ранних сроках беременности (от оплодотворения до стадии бластоцисты), либо вызывают гибель зародыша (**бластопатии**), либо зародыш выживает и рождается без видимых ВПР. При этом, однако, никогда нельзя исключить у плода наличие хромосомного мозаицизма, особенно в случае действия специфических мутагенных факторов или препаратов. Считается, что такая реакция зародыша человека на повреждающий агент сохраняется до 15-го дня беременности (Wilson J.G., 1965).

Повреждения в период имплантации и раннего постимплантационного периода (до 12-й недели беременности у человека) воздействуют на зародыш, находящийся на стадии нейрулы (стадии VIII–IX), закладки осевого комплекса (стадии IX–X) и активного органогенеза (стадии XII–XXII) (см. главу II). Они не только индуцируют гибель, но могут быть причиной грубых ВПР (**эмбриопатий**), многие из которых выявляются еще до рождения при УЗИ и не совместимы с постнатальной жизнью. В период активного органогенеза зародыши человека обнаруживают особенно высокую чувствительность к действию самых разных повреждающих агентов. Нет сомнения поэтому, что зародыш человека во время имплантации и раннего постимплантационного развития (см. табл. 2.1) нуждается в особенно тщательной защите от действия всевозможных повреждающих факторов.

Опасность возникновения ВПР сохраняется и при действии тератогенов в течение последующих стадий эмбриогенеза, хотя по мере развития тяжесть аномалий и их частота постепенно уменьшаются. Нарушения развития, индуцированные в плодный период (**фетопатии**), нередко совместимы с жизнью после рождения. Однако при этом нарушения могут касаться таких важнейших функций и систем развивающегося организма, как эндокринная, половая, иммунная, ЦНС, следствием которых могут быть тяжелые, инвалидизирующие пороки.

Таким образом, *признавая объективное существование в эмбриогенезе человека критических периодов развития, следует помнить, что зародыш человека должен быть максимально огражден от действия повреждающих внешних факторов в те-*

чение всего внутриутробного периода, а не только во время ранних стадий развития.

4.2.2. Экзогенные факторы, тератогенные для плода человека

Опыт тератологических исследований на лабораторных млекопитающих позволяет с уверенностью констатировать, что практически любое повреждающее воздействие, в том числе любой лекарственный препарат, примененный в определенной дозировке и на определенной стадии эмбриогенеза (обычно в период активного органогенеза) обнаруживает тератогенные свойства. Достаточно отметить, что, согласно классическому труду американского тератолога Томаса Шепарда (Shepard Th., 1998), тератогенное воздействие в эксперименте уже установлено для 3000 химических, в том числе и лекарственных, препаратов. К счастью, далеко не все из них, а только некоторые, представляют реальную опасность для зародыша человека.

Экзогенные факторы с доказанной тератогенной активностью у человека (см. табл. 4.2) могут быть физическими (облучение, механические воздействия, гипертермия), биологическими (токсоплазмоз, краснуха, сифилис) и химическими (лекарственные препараты). К ним могут быть причислены и некоторые нарушения метаболизма у матери (сахарный диабет, гипотиреоз, фенилкетонурия). Особенно важную и наиболее спорную группу составляют лекарственные вещества, химические препараты и некоторые вредные привычки (алкоголь, курение).

Веществ, в том числе лекарств, с доказанной тератогенной активностью для человека сравнительно немного – около 30 (Shepard Th., 1998). К ним относятся ряд противоопухолевых препаратов, некоторые антибиотики, печально знаменитый талидомид, соли ртути. К веществам, опасность которых для плода человека велика, хотя окончательно и не доказана, относятся аминогликозиды, некоторые противоэпилептические препараты (дифенилгидантоин), некоторые гормоны (эстрогены, искусственные прогестины), полибифенилы, препараты вальпроевой кислоты, избыток витамина А, ретиноевой кислоты, эретинат (препарат для лечения псориаза). Более подробную информацию об этих и других препаратах, зачастую применяемых при беременности, можно найти в ряде

Таблица 4.2

Экзогенные факторы, тератогенные для плода человека

| Химические вещества | Инфекционные болезни | |
|---|---|------------------------|
| Алкоголь Андрогенные гормоны Антikonвульсанты (дифенин и др.) Аминогликозиды (амикацин, гентамицин, стрептомицин и др.) Антиметаболиты (меркаптопурин, метотрексат) Вальпроевая кислота Варфарин Гормоны (андрогены) Диэтилстильбестрол Избыток витамина А Кокаин Метимазол Миноксидил Органические соли ртути Полибифенилы Противоопухолевые препараты (циклофосфамид и др.) Ретиноевая кислота Стрептомицин Талидомид Тетрациклин Триметадион Эретинат (псориаз) | Герпес Краснуха Парвовирус В-19 Сифилис Токсоплазмоз Цитомегаловирус | |
| | <th data-bbox="515 524 951 588">Болезни матери</th> | Болезни матери |
| | Аутоиммунные заболевания Вирилизующие опухоли Гипо- и гипертиреоз Сахарный диабет Фенилкетонурия Эпилепсия | |
| | <th data-bbox="520 815 951 880">Физические воздействия</th> | Физические воздействия |
| | Гипертермия Ионизирующее излучение Механические нарушения | |

недавно вышедших отечественных монографий по проблемам тератологии у человека (Карпов О.И., Зайцев А.А., 1998; Вихрук Т.И. и др., 2001). Не вызывает сомнения выраженное повреждающее действие на плод человека и таких вредных факторов, как алкоголь (алкогольный синдром плода), курение (общая задержка развития) и ожирение матери (корреляция с дефектами зарощения невральной трубки).

4.2.3. Другие характеристики тератогенов

Для реализации потенциального тератогенного эффекта химического препарата решающее значение имеют и такие параметры, как доза, проницаемость плаценты, особенности метаболизма в организме матери и плода, скорость выведения препарата из организма. Все эти параметры следует учитывать при необходимости назначения лекарств беременным женщинам.

Большие дозы препарата, его длительное применение, как правило, более пагубны для развития зародыша, чем однократное использование того же самого препарата в малых, терапевтических дозах.

Следует напомнить два существенных обстоятельства. Инstrukция к применению каждого лекарственного препарата содержит информацию о возможности или ограничениях его использования при беременности. Несмотря на это, по данным ВОЗ, практически любая женщина принимает при беременности в среднем около 5 различных лекарств. Важно, однако, чтобы эти препараты не относились к группе риска. Типичные ситуации, связанные с приемом лекарств, особенности подбора препаратов, необходимых для лечения при беременности, подробно освещены в серии наших обзоров (Вахарловский В.Г. и др., 1999; 2004). Ценная информация на эту тему может быть получена и в цитированных выше монографиях (Shepard Th., 1998; Карпов О.И., Зайцев А.А., 1998; Вихрук Т.И. и др., 2001).

4.2.4. Особенности генотипа матери и плода

Как уже отмечалось, опасность тератогенного эффекта повреждающих воздействий на плод во многом определяется и особенностями метаболизма химических веществ и лекарств в организмах матери и плода. Решающую роль в этом играет состояние генов системы детоксикации (метаболизма). Известно, что любой ксенобиотик, поступающий в организм, подвергается действию комплекса ферментов, входящих в систему детоксикации, которая обычно состоит из нескольких последовательных фаз: активации (1), нейтрализации (2) и выведения (3). Каждая из этих фаз контролируется специфическим набором ферментов. В связи с полиморфизмом генов системы детоксикации, контролирующих синтез этих ферментов, каждый человек характеризуется своими уникальными особенностями метаболизма лекарственных препаратов, своей **фармакогенетикой** (Баранов В.С., 2000). Естественно, что состояние системы детоксикации, т.е. индивидуальные особенности фармакогенетики каждой беременной, должно учитываться при назначении препаратов, особенно тех, повреждающее действие которых на плод представляется вероятным. Тестирование полиморфизмов генов системы детоксикации предусматривает «Генетическая карта

репродуктивного здоровья», разработанная в лаборатории пренатальной диагностики НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН (см. главу XV) (Баранов В.С., 2000; 2004).

4.3. ТЕРАТОЛОГИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ

Примерно в 7% случаев поводом для обращения в медико-генетический кабинет акушерско-гинекологической клиники является выяснение возможного тератогенного воздействия на плод того или иного препарата, который женщина применяла незадолго до беременности или на ее ранних сроках. Чаще всего эти воздействия приурочены к первым неделям, когда женщина еще не знает о начавшейся беременности.

В инструкциях, прилагаемых к фармакологическим препаратам, нередко указывается, что их применение не рекомендовано при беременности, т.е. потенциально они могут представлять опасность для плода и здоровья будущего ребенка. Подобные рекомендации, как правило, основываются на экспериментальных данных по изучению тератогенного действия препарата, либо, что бывает редко, на сходстве фармакологических и биохимических характеристик препарата с таковыми у химических соединений с доказанной тератогенной активностью (Материалы ВОЗ, 1988).

В настоящее время в мировой фармакологической практике для каждого нового лекарственного препарата до его внедрения в клинику проводится тестирование на тератогенную активность. Без такого тестирования ни один препарат не допускается для клинического применения. Вместе с тем, известно, что применяемые схемы тератологического тестирования на лабораторных животных не являются абсолютно надежными (Дыбан А.П., 1966). Это связано с видовыми различиями реакции организма животных и человека на тератогены, различиями в их фармакодинамике, метаболизме, в продолжительности беременности, в особенностях внутриутробного развития лабораторных млекопитающих в сравнении с человеком и прочее. Более того, применяемые в клинике дозировки препаратов нередко во много раз (в пересчете на вес тела) меньше таковых в тератологических экспериментах. Все эти обстоятельства ставят перед врачами серьезные проблемы при необходимости критической оценки и прогнозирования возможного повреждающего действия на плод тех или

иных препаратов, применяемых для лечения, в частности, внутриутробных инфекций или использования физических методов, связанных с облучением плода, и т.д.

В данном разделе на основании собственного многолетнего опыта и данных литературы рассмотрены некоторые особенности консультирования беременных, подвергавшихся различным воздействиям, в том числе лекарственных препаратов, непосредственно перед зачатием и во время беременности.

Беременных, озабоченных действием на плод повреждающих факторов, можно разделить на три группы (Вахарловский В.Г. и др., 2004). **Первая** представлена женщинами, которые не планировали беременность, но последняя состоялась на фоне применения каких-либо фармакологических препаратов во II фазу цикла. Чаще всего такое лечение бывает связано с острыми респираторными инфекциями, бесплодием и/или хроническими заболеваниями половых органов, эндометриозом, миомой матки и т.д. К этой группе относятся также женщины, которым во второй фазе менструального цикла производились те или иные диагностические и лечебные процедуры (биопсия эндометрия, ультразвуковое сканирование, гистеросальпингография и прочее).

Ко **второй** группе относятся женщины, которые знали о наступившей беременности, но вынуждены были из-за тяжести состояния принимать различные лекарства по поводу острых, чаще воспалительных, заболеваний.

Третью группу составляют беременные с наследственными, системными и хроническими заболеваниями, чаще эндокринной (сахарный диабет, гипер- и гипотиреоз и т.д.) и нервной систем (эпилепсия, торсионная дистония, гепатолентикулярная дегенерация и т.д.). Несмотря на наличие беременности пациенты вынуждены продолжать принимать препараты, чтобы избежать ухудшения состояния в связи с прогрессированием основного заболевания.

Нередко женщины обращаются за консультацией в связи с проведенными флюорографическими обследованиями или гистеросальпингографией, выполненными до установления беременности. Средняя доза облучения в этих случаях не превышает 1 рентгена. А.П.Кирющенко в 1978 г. писал, что доза радиации в любой критический период развития зародыша не должна превышать 1 рентген (Кирющенко А.П., 1978). Нет

сомнения в том, что и сегодня к рентгеновскому обследованию беременных нужно прибегать лишь в исключительных случаях.

В отличие от лучей Рентгена, использование ультразвукового исследования (УЗИ) при беременности не является опасным. В этом убеждают не только данные экспериментов, но более чем тридцатилетний мировой опыт работы по УЗ-сканированию плодов человека на разных сроках беременности. Уже родились и имеют потомство миллионы женщин и мужчин, подвергавшихся УЗИ еще во внутриутробный период развития. Однако никаких сколько-нибудь убедительных данных о повреждающем действии УЗИ плода на последующее постнатальное развитие человека пока не известно. По-видимому, безвреден для плода и такой вариант УЗИ, как цветная доплерометрия. Последнюю, однако, рекомендуют применять при исследовании плода, начиная со II триместра беременности (Юдина Е.В., Медведев М.В., 2002).

Вместе с тем, при использовании УЗИ в акушерстве и гинекологии многие авторы призывают придерживаться принципа ALARA – «As Low As Reasonably Achievable», т.е. «так мало, как благоразумно достижимо». Придерживаться этого принципа рекомендует и Европейская ассоциация перинатальной медицины (Carrera J.M., Di Renzo G.C., 1993). В настоящее время согласно Приказу МЗ РФ № 457 от 28.12. 2000 г. всем беременным рекомендуется трехкратное УЗИ на 10–14-й, 18–22-й и 30–32-й неделях беременности.

Чаще других при беременности принимают антибактериальные препараты и, прежде всего, антибиотики. Обычно их применяют во II триместре беременности, т.е. уже после завершения плацентации и активного органогенеза. Однако иногда (при остром заболевании) показано назначение антибиотиков в I триместре. В этих случаях рекомендуются препараты пенициллинового ряда и цефалоспорины, которые не оказывают отрицательного действия на плод (Ostensen M., Ostensen H., 1996). В связи с широким распространением генитальных инфекций, особенно хламидиоза, нередко применяются препараты тетрациклинового ряда – тетрациклин, метациклин, доксициклин. Препараты этой группы легко преодолевают плацентарный барьер и в отдельных случаях могут оказывать тератогенное действие на плод (Czeizel A.E. et al., 2001). Тетрациклины образуют комплексы с кальцием

и откладываются в зачатках костей и зубов, нарушая в них синтез белка. Концентрация тетрациклинов в пуповинной крови может достигать 10–15% от уровня их содержания в крови матери.

При изучении состояния 64 детей в возрасте от 1 до 6 лет, родившихся от матерей, получавших в период беременности малые дозы тетрациклина в виде мазей, не было выявлено никаких врожденных дефектов (Кирющенко А.П., 1988). Анализ здоровья детей (21 человек) в возрасте 3–4 лет, матери которых в I триместре беременности получали курсы лечения антибиотиками тетрациклинового ряда в терапевтических дозах и метронидазол (17 детей) по поводу воспалительных заболеваний мочеполовой системы, не выявил какой-либо патологии, указывающей на отрицательное действие этих лекарств. Безвредными для плода человека оказались и малые дозы аспирина – 0,25–0,5 г/день. Все эти наблюдения свидетельствуют о том, что вопрос о лечении беременных малыми дозами антибиотиков тетрациклинового ряда следует решать положительно.

Подобная стратегия должна соблюдаться в отношении метронидазола (флагила, трихопола), бактрима (Карпов О.И., Зайцев А.А., 1998). Сообщается также о 45 беременных, страдавших ревматизмом и принимавших во время беременности нестероидные противовоспалительные препараты. Ни у одного из родившихся у них детей не найдено никаких проявлений тератогенного влияния (Ostensen M., Ostensen H., 1996).

Антибактериальная терапия при урогенитальной инфекции у беременных проводится с учетом характера возбудителя, его чувствительности к препарату и т.д. При беременности противопоказаны препараты пролонгированного действия и длительные курсы лечения. Курсы лечения обычно составляют 5–10 дней (Машковский М.Д., 1993). Акушер должен постоянно помнить о максимальном сокращении периода болезни, особенно если она совпадает с критическим периодом развития плода.

Согласно мнению академика Г.И.Лазюка, достоверные данные о тератогенном действии на эмбрион человека антибиотиков и антибактериальных средств, принимаемых в терапевтических дозах, отсутствуют (Лазюк Г.И., 1991). Принято считать, что первые две недели беременности не опасны в плане формирования пороков: зародыш либо погибает до

или вскоре после имплантации, либо развивается нормально (см. 4.2). Опасность для плода человека на этих стадиях могут представлять противоопухолевые препараты (циклофосфан и т.д.), в том числе антибиотики (актиномицин и др.), применяемые для лечения больных с онкологическими заболеваниями (см. 4.2.2).

Нередко обращаются беременные и по поводу применения кортикостероидных препаратов, которые назначают при недостаточности коры надпочечников, коллагенозах (системная красная волчанка, преднизолонзависимая бронхиальная астма и др.). Отмена лечения чревата заметным ухудшением состояния беременной, может приводить к «синдрому отмены». Имеются указания на то, что кортикостероидные препараты в больших дозах во время беременности могут приводить к расщелине твердого неба, недостаточности коры надпочечников, гипогликемии, отставанию умственного развития, внутриутробной гибели плода (Вихрук Т.И. и др., 2001).

В экспериментах на мышях кортикостероидные препараты при введении в период органогенеза индуцировали аномалии лицевого черепа, надпочечников, глаз и конечностей, отмечались расщелина твердого неба, катаракта (Чеботарь Н.А. и др., 1994). Вместе с тем, большой клинический опыт свидетельствует о том, что во время беременности применение этой группы препаратов не противопоказано (Кирющенко А.П., 1988; Кошелева Н.Г. и др., 2002). Их назначение зависит от показаний и проводится под контролем содержания стероидов в крови и в моче. Безопасными для беременных являются следующие кортикостероиды: кортизона ацетат в дозах от 50 до 100 мг, преднизолон — 5–20 мг или эквивалентные дозы других препаратов сходного действия (Хэдден Д.Р., 1985).

Большую тревогу о здоровье будущего ребенка испытывают беременные, страдающие эпилептической болезнью. Согласно мнению специалистов, беременность не противопоказана больным эпилепсией в случаях стойкой ремиссии заболевания и при субкомпенсации с редкими эпилептическими припадками (Карлов В.А., Власов П.Н., 1996). Противопоказанием к беременности является устойчивая к лечению эпилепсия с частыми припадками. Терапия проводится с использованием минимальных эффективных доз противосудорожного препарата и, по возможности, в виде монотерапии. Пре-

паратом выбора в этих случаях является финлепсин (синонимы: карбамазепин, тегретол).

Другие препараты из этой группы обладают явным тератогенным действием. Так, исследована частота *spina bifida* у 261 ребенка, матери которых длительное время получали противосудорожный препарат депакин (синонимы: вальпроевая кислота, конвулекс) (Omtzigt J.G.C., Lindhond D., 1993). Частота этого порока в данной выборке составила 8,3%. В случае других противосудорожных препаратов частота *spina bifida* составила 6,9%. В целом, у детей, матери которых больны эпилепсией и принимали препараты вальпроевой кислоты, пороки развития встречались в 2–3 раза чаще, чем у беременных, получавших другие противосудорожные средства (Raymond G. et al., 1993).

Существуют данные, что применение во время беременности дифенилгидантоина (синонимы: дилантин, дифенин, гидантоин) приводит в 2–5-кратному увеличению частоты ВПР. Развивается так называемый *гидантоиновый синдром*, для которого характерны отставание психического развития, задержка роста, расщелина твердого неба и верхней губы, спинно-мозговые грыжи, гипоплазия ногтевых фаланг и ногтей пальцев; вдавление переносицы и скошенные вверх брови.

Американское общество акушеров-гинекологов рекомендует, по возможности, воздерживаться от использования препаратов фенobarбиталового ряда во время беременности ввиду их возможного тератогенного действия на плод. Известно, что у женщин, длительное время принимавших противосудорожные препараты, в 3–4 раза снижено содержание фолиевой кислоты, поэтому во время беременности они должны обязательно получать большие дозы этого препарата. Фолиевая кислота (ФК) является хорошим протектором ряда патологических состояний у плода, поэтому ее применение до беременности рассматривается как важный способ прекоцепционной профилактики ВНЗ (см. главу I). ФК следует принимать за 2–3 мес. до зачатия по 400 мкг/день и продолжать прием до 10 нед. беременности. Это позволяет существенно снизить частоту аномалий, связанных с дефектами зарощения нервной трубки — ДЗНТ (анэнцефалии, спинно-мозговых грыж) и уменьшает вероятность хромосомных болезней у плода. Такая профилактика особенно показана для женщин, которые являются носителями функционально неполноцен-

ного варианта (мутации С677Т) гена метилентетрагидрофолатредуктазы — фермента, ответственного за превращение ФК в ее метаболически активную форму — тетрагидрофолиевую кислоту (Evans M.I. et al., 2004). Частота этой мутации у населения России находится в пределах 5–10% (Баранов В.С. и др., 2000). Выявление женщин с мутантным вариантом этого гена еще в прекоцепционном периоде и назначение им профилактического приема больших доз фолиевой кислоты имеет важное практическое значение для предупреждения врожденных пороков развития и хромосомных болезней у плода (см. главу XV). По рекомендации Комитета США по контролю за пищевыми продуктами и медикаментами (Food and Drug Administration — FDA) с 1995 г. в хлеб и некоторые другие мучные продукты добавляется фолиевая кислота (Evans M.I. et al., 2004). В результате в 2001 г. по сравнению с 1990 г. рождение детей с ДЗНТ в США уменьшилось на 19%. Отмечено и уменьшение частоты болезни Дауна у плода (Rampersaud G.C. et al., 2003).

Мы наблюдали больных со склеродермией и с наследственной болезнью — гепатолентикулярной дегенерацией (болезнь Вильсона—Коновалова), которые, несмотря на строгие предупреждения врачей, беременели и рожали здоровых детей (Вахарловский В.Г. и др., 2003). Известно, что для таких больных препаратом выбора является пеницилламин. Существует опасность, что вследствие подавления пеницилламином синтеза коллагена у плода (новорожденного) может сформироваться фенкопия (псевдосиндром) наследственной болезни Элерса—Данло. Вместе с тем, очевидно, что отмена препарата приводит к ухудшению состояния. Наш опыт показывает, что на фоне небольших доз пеницилламина (300–400 мг/день) поддерживалась стабильная картина основного заболевания и беременность протекала без особенностей (Вахарловский В.Г. и др., 1982; 1997). Дети от матерей с болезнью Вильсона—Коновалова уже достигли двадцатипятилетнего возраста и развиваются нормально. Вполне здоровым выглядит и 8-летний ребенок от матери со склеродермией. Таким образом, мы не наблюдали побочных действий пеницилламина. Учитывая, однако, многообразие возможных проявлений тератогенной активности (морфологические, биохимические, стойкие функциональные и др.), даже весьма продолжительные наблюдения все еще единичны и пока недостаточны для

полного исключения повреждающего эффекта лекарственного препарата на плод. Данное обстоятельство необходимо учитывать при выработке рекомендаций по ведению беременности и прогнозированию ее исходов.

Довольно редко в противоопухолевых препаратах нуждаются беременные, страдавшие или страдающие онкологическими заболеваниями, но категорически настроенные вынашивать беременность. К сожалению, практически все препараты цитостатического действия являются тератогенами. В частности, метотрексат — антиметаболит, действие которого связано с ингибированием фермента метилентетрагидрофолатредуктазы, превращающего фолиевую кислоту в ее активную форму (см. выше). Последняя участвует в биосинтезе нуклеиновых кислот. Ее дефицит способствует не только тератогенному, но и мутагенному эффекту (см. главу XV). Прием метотрексата даже до беременности может быть причиной хромосомной патологии у плода. При действии метотрексата в I триместре беременности возможно формирование дефектов центральной нервной системы, кроветворного аппарата, костной и мочевыделительной систем. Имеются многочисленные данные о тератогенном действии и других противоопухолевых препаратов (Лазюк Г.И., 1991).

Таким образом, применение метотрексата и других противоопухолевых препаратов в первые недели беременности следует рассматривать как веское основание для прерывания беременности. При настоятельном желании женщины сохранить беременность необходимо УЗИ исследование в динамике, дополненное биохимическим анализом эмбриональных маркерных белков в сыворотке крови с целью выявления пороков развития у плода. Проведение пренатального кариотипирования плода оправдано только в случае применения женщиной или супругом противоопухолевых препаратов до зачатия. Если цитостатическое лечение проводилось уже во время беременности, то кариотипирование плода не оправдано, так как не дает дополнительной информации о состоянии генома плода и, соответственно, о прогнозе исхода беременности.

Не вызывает сомнения, что если лечение заболевания матери представляет определенный риск для плода, то врач, прежде чем начать терапию, должен разъяснить пациентке все положительные и отрицательные стороны такой терапии.

Таким образом, анализ данных литературы и наш собственный опыт, основанные на многочисленных клинических наблюдениях, показывают, что проведение ряда диагностических процедур и применение во время беременности некоторых лекарственных препаратов далеко не всегда завершается рождением ребенка с аномалиями развития или другими проявлениями тератогенного действия. Правда, как указывалось выше, во всех подобных случаях трудно судить о возможных отдаленных последствиях такой внутриутробной «терапии». Мы вполне осознаем известную ограниченность в экстраполяции на человека результатов тестирования на лабораторных животных тератогенной активности лекарств. Вместе с тем, учитывая печальный мировой опыт с препаратом талидомидом («талидомидная» трагедия 1960-х годов, приведшая к рождению десятков тысяч детей с тяжелыми врожденными пороками развития), нельзя игнорировать существующие ограничения по приему лекарств при беременности.

Практика показала, что каждая женщина во время беременности принимает, в среднем, около 4–5 лекарств, в том числе и не рекомендованные к употреблению в этот период. Естественно, что такие случаи нуждаются в самой тщательной и детальной проработке в отношении тактики ведения беременности, необходимости инвазивной пренатальной диагностики, исходов родов и долгосрочного прогнозирования.

Определенную помощь в принятии решения могут дать соответствующие справочные руководства по клинической и экспериментальной тератологии, суммирующие мировой опыт по тератогенной активности лекарственных препаратов в эксперименте и в клинической практике. Существуют и уже используются специальные компьютерные программы, облегчающие поиск такой информации (Карпов О.И., Зайцев А.А., 1998; Shepard Th., 1998). Однако ее оценка и адекватная интерпретация могут быть сделаны только специалистами по пренатальной диагностике в сотрудничестве с акушерами-гинекологами. Рекомендации по прерыванию беременности после воздействия лекарственных препаратов или, наоборот, возможность ее продолжения должны быть четко продуманы и взвешены с учетом того клинического опыта, который накоплен по данной проблеме. Подход к каждому такому случаю должен быть строго индивидуальным. Задача

медико-генетического консультирования в условиях акушерско-гинекологической клиники сводится только к расчету эмпирического риска врожденной и наследственной патологии у плода. Окончательное решение о судьбе беременности принимает только сама женщина, получившая максимально объективную информацию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тератология – наука о возникновении, диагностике и профилактике врожденных пороков (уродств). Врожденные пороки развития (ВПР) – это стойкие морфологические, биохимические и функциональные нарушения у плода, обусловленные повреждающим действием экзогенных или эндогенных факторов во время беременности.

Зародыши человека обнаруживают повышенную чувствительность к действию различных повреждающих факторов как наследственной, так и экзогенной природы. Их особенно высокая чувствительность к тератогенам отмечается во время 1-го (имплантация, бластуляция) и 2-го (активный органогенез, плацентация) критических периодов развития. Учитывая специфику повреждающих агентов, многоэтапность формирования многих жизненно важных систем организма, необходимо рационально организовать защиту плода не только во время критических периодов развития, но и в течение всего внутриутробного периода.

Тератогенная активность химических веществ зависит от стадии эмбриогенеза, специфики самого препарата, его дозы, особенностей метаболизма в организмах матери и плода. Факторы, обладающие тератогенным действием, могут быть химическими, физическими, биологическими. Тератогенными для плода человека могут также быть некоторые тяжелые метаболические нарушения у матери. Число факторов с доказанной тератогенной активностью для плода человека невелико. Применение препаратов во время беременности следует по возможности ограничивать. В случае необходимости оно должно проводиться только по назначению врача.

Важная роль в профилактике возможного тератогенного эффекта принадлежит медико-генетическому консультированию, пренатальной диагностике, определению индивидуальной фармакогенетической чувствительности (генетическая карта репродуктивного здоровья) и, наконец, рациональной

преконцепционной профилактике. Основу последней составляет прием терапевтических доз фолиевой кислоты и мультивитаминов до зачатия и на протяжении первых месяцев беременности. Как показывает мировой опыт, меры прекоцепционной профилактики особенно эффективны в профилактике врожденных пороков центральной нервной системы.

На основании собственного опыта и литературных данных рассмотрены особенности тератологического консультирования. Главные из них – невозможность полностью избежать приема лекарств при беременности (1), преувеличенная опасность тератогенного действия фармпрепаратов на плод (2); необходимость строго индивидуального подхода к оценке риска повреждающего эффекта с учетом срока беременности, дозы препарата, длительности лечения, типа заболевания и характера его течения (3); необходимость подбора фармпрепаратов, обладающих минимальным повреждающим эффектом на плод в условиях хронических заболеваний беременной (4); некорректность экстраполяции на человека результатов тестирования тератогенной активности на экспериментальных животных (5); ограниченность инструментальных (УЗИ) и лабораторных (маркерные белки в крови женщины) возможностей объективной оценки состояния плода после приема фармпрепаратов или повреждающих воздействий во время беременности (6).

ГЛАВА V. ОСОБЕННОСТИ МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНСУЛЬТИРОВАНИЯ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

Медико-генетическое консультирование (МГК) является важнейшей составляющей в комплексе не прямых методов обследования беременной женщины с целью профилактики наследственных и врожденных болезней (см. главу III). *Суть МГК заключается в определении прогноза рождения ребенка с наследственной и врожденной патологией, в объяснении вероятности неблагоприятного исхода беременности и в помощи женщине (семье) в принятии решения о деторождении.* Следует иметь в виду, что медико-генетическое консультирование в ПД имеет свои характерные особенности, отличающие его от традиционной работы врача-генетика. Прежде всего, *его основной целью является разработка алгоритма профилактики наследственной и врожденной патологии.* Важно аргументированно принять решение о целесообразности направления беременной на инвазивную диагностику для исключения хромосомной или генной патологии у плода.

В идеальном варианте медико-генетическое консультирование должны пройти все семьи, планирующие ребенка, и все женщины, направляемые на ПД (проспективное консультирование). Реально все вопросы медико-генетического консультирования решаются в медико-генетических консультациях и в Центрах планирования семьи.

Следует отметить, что характер медико-генетического консультирования и соответствующих рекомендаций при физиологической (естественной) беременности и беременности в результате искусственного оплодотворения в рамках программ вспомогательных репродуктивных технологий имеют свои особенности. Оба варианта медико-генетического консультирования рассмотрены в данной главе.

5.1. МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ ПРИ ЕСТЕСТВЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Как известно (Новиков П.В., Вельтищев Ю.Е., 2002; Гинтер Е.К., 2003; Бочков Н.П., 2004; Harper P., 2003), основные задачи медико-генетического консультирования включают:

- уточнение диагноза наследственного заболевания с помощью генетических методов;
- определение типа наследования патологии в семье;
- составление прогноза рождения ребенка с наследственным заболеванием или врожденной патологией не наследственного происхождения (расчет риска);
- информация о вероятности рождения ребенка с мультифакториальным заболеванием в семье высокого риска;
- определение наиболее эффективного способа профилактики;
- объяснение в доступной форме смысла медико-генетического заключения и помощь семье в принятии решения;
- социальная помощь и адаптация семьи к жизни с больным ребенком.

В медико-генетическом кабинете (отделении, центре) врач-генетик ведет прием больного с предполагаемой или уже диагностированной наследственной патологией и его родственников. В медико-генетическом кабинете акушерско-гинекологической клиники более чем в 90% случаев консультируются беременные женщины, их мужья и родственники. *Основной задачей врача-генетика является разработка алгоритма профилактики врожденной и/или наследственной патологии по результатам обследования беременной женщины и членов ее семьи (супруга, детей и т.д.) с целью оценки состояния плода и необходимости проведения пренатальной диагностики (ПД) с применением инвазивных методов получения плодного материала или других методов ПД.*

Плод в данной ситуации так же, как и мать, является пациентом, хотя и весьма необычным. Вместе с матерью он составляет одно целое. Но, по сути, это два генетически разных организма. Анатомо-морфологические и физиологические характеристики плода постоянно изменяются в полном соответствии с программой работы его генома.

Изучение нормального и патологического развития человека в течение внутриутробного периода жизни, исследова-

ние этиологических и патогенетических механизмов формирования врожденной и наследственной патологии, описание их клинических характеристик у плода, разработка методов их лечения и профилактики формируют новое направление клинической медицины – **фетологию** (Вахарловский В.Г., 1994; Вахарловский В.Г., Баранов В.С., 2003). **Именно фетология в сочетании с медицинской генетикой составляют научно-методическую основу медико-генетического консультирования в акушерско-гинекологической клинике.**

Естественно, что консультация для решения вопроса о целесообразности инвазивной ПД и заключительная консультация при выдаче ответа после лабораторных исследований материала плода требуют от врача-генетика не только глубоких знаний по медицинской генетике, но и широкой эрудиции в области репродукции человека, эмбриологии, тератологии, педиатрии и акушерства.

Не случайно в зарубежной литературе используют понятие **«репродуктивное консультирование»**. Оно включает **консультацию семей, планирующих рождение ребенка, преконцепционное МГК, рекомендации по подготовке к беременности и оценку риска ВНЗ, направление на инвазивную ПД (см. главу IV) с последующим цитогенетическим, молекулярным и биохимическим исследованием плодного материала.**

В идеальном варианте МГК может быть рекомендовано каждой семье, планирующей ребенка, и каждой беременной женщине.

Прямыми показаниями для направления беременной к врачу-генетику в акушерской клинике являются:

- наличие точно установленной или предполагаемой хромосомной болезни у кого-либо из супругов или других членов семьи;
- рождение ребенка с хромосомной болезнью или прерывание беременности в связи с установленной в результате ПД хромосомной патологией у плода;
- аномалии кариотипа у супругов или членов их семей;
- моногенное заболевание у супругов, их детей, у других членов семьи или у плода в предыдущей беременности, которая была прервана после ПД моногенного заболевания;
- МВПР или врожденная умственная неполноценность у кого-либо из супругов, их детей и других членов семьи; наличие МВПР у плода при предыдущей беременности;

- воздействие возможных тератогенов (мутагенов) до или в течение первых трех месяцев беременности;
- высокий риск патологии плода по результатам биохимического скрининга маркерных сывороточных белков беременной;
- наличие ультразвуковых маркеров наследственных болезней у плода;
- возраст беременной 35 лет и старше.

В отличие от традиционного медико-генетического консультирования, врач-генетик акушерско-гинекологической клиники в силу лимита времени, обусловленного сроками ПД, как правило, лишен возможности заниматься точной диагностикой наследственной патологии и дожидаться результатов специальных лабораторных исследований у беременной или членов ее семьи. Вместе с тем, он должен критически относиться ко всем представленным медицинским документам, убедиться в истинности диагноза, особенно если это касается семейной наследственной патологии, послужившей причиной для направления к врачу-генетику. В большинстве случаев, когда на консультацию обращаются женщины, имеющие больного ребенка, для оценки повторного риска врач-генетик должен провести личное обследование больного ребенка или для уточнения диагноза направить его к соответствующему специалисту. ***Задача врача-генетика – оценить степень риска наследственной (врожденной) патологии у плода и направить к врачу-акушеру для решения вопроса о возможности и сроках проведения инвазивной ПД.*** С целью уточнения диагноза и с учетом срока беременности возможно проведение вирусологических, иммунологических, эндокринологических и других специальных обследований как самой беременной, так и ее супруга.

При изолированной умственной отсталости у первого ребенка беременной перед назначением пренатального кариотипирования рекомендуется исследование кариотипа больного ребенка. Известно, что примерно 15% случаев умственной отсталости у детей обусловлено аномалиями кариотипа (Новиков П.В., Вельтищев Ю.Е., 2002), что делает оправданной ПД при повторной беременности.

Примерно 80% медико-генетических консультаций в акушерско-гинекологической клинике приходится на беременных женщин в возрасте 35 лет и старше, которые согласно су-

шествующему Приказу МЗ РФ №457 от 28.12.2000 г. имеют абсолютные показания к пренатальному кариотипированию. Поэтому при поступлении в центр ПД они могут быть направлены непосредственно к врачу-акушеру для решения вопроса о сроках и способах инвазивной ПД. Однако, по нашему убеждению, консультация врача-генетика и в этом случае весьма желательна. Профессиональное составление родословной и обсуждение генеалогических особенностей семьи, предоставление объективной информации о целях инвазивных вмешательств — задачи врача-генетика.

Важно проинформировать пациентку, что ни данные УЗИ, ни благоприятные показатели биохимического скрининга не позволяют со 100% вероятностью исключить синдром Дауна и другие хромосомные болезни у плода. Однако при наличии нормальных показателей биохимического и ультразвукового скрининга риск хромосомных болезней у плода существенно снижается.

Перед врачом-генетиком может также стоять задача дать квалифицированную медико-генетическую оценку патолого-анатомическим данным. Информация, представленная в протоколе вскрытия плода после прерывания беременности или ребенка, погибшего в первые сутки жизни, обычно очень скудна. Между тем, известно, что МВПР у плода в 17% случаев сопровождается хромосомной патологией (Бочков Н.П., 2002). Поэтому наличие МВПР у плода при предыдущей беременности является одним из показаний для проведения кариотипирования при последующей беременности. Однако заключение о множественности пороков развития не всегда соответствует действительности. Наиболее частой ошибкой является неправильная интерпретация природы отмеченных пороков развития. Так, нередко к МВПР относят наличие спинно-мозговой грыжи и вальгусное (варусное) положение стоп в сочетании с парезом нижних конечностей. В действительности, эта патология, как правило, представляет собой изолированный врожденный порок — поражение позвоночника и спинного мозга, при котором отмечается парез нижних конечностей с патологическим положением стоп. Кариотип, как правило, не изменен. Пренатальное кариотипирование при последующей беременности в этом случае не показано.

Примерно в 7% случаев поводом для обращения в медико-генетический кабинет акушерско-гинекологической кли-

ники является выяснение возможного отрицательного (тератогенного) воздействия на плод того или иного лекарственного препарата, который женщина применяла во время беременности. Также возникают вопросы по поводу проведения рентгенологических диагностических исследований во время беременности и ультразвукового сканирования плода или внутренних органов беременной. Особенности консультирования по вопросам возможного тератогенного действия на плод повреждающих факторов внешней среды, в том числе лекарственных препаратов, рассмотрены в главе IV.

Напряженной работы врача-генетика требует прием беременных в связи с интерпретацией результатов биохимического и УЗ скрининга. Практически каждой пациентке необходимо объяснять суть и задачи скрининга, подробно прокомментировать результаты, дать критическую оценку выраженного в процентах риска рождения ребенка с болезнью Дауна по результатам БС.

При проведении медико-генетического консультирования важно помнить, что вероятность хромосомной патологии у плода значительно варьирует в зависимости от возраста беременной, который в настоящее время рассматривают в качестве единственного точно установленного фактора, влияющего на частоту болезни Дауна у плода. Уместно напомнить, что зависимость частоты болезни Дауна у плода от возраста матери характеризуется некоторым подъемом у беременных в возрасте до 19 лет, снижением к 20 годам и последующим прогрессивным нарастанием, особенно выраженным после 35 лет (Фогель Ф., Мотульски А., 1989). Увеличение риска рождения ребенка с болезнью Дауна у женщин до 19 лет ранее было отмечено и в отечественной литературе (табл. 5.1) (Штильбанс И.И., 1965). Причины увеличения риска болезни Дауна в этой возрастной группе неясны. Возможно, отчасти оно обусловлено нестабильностью гормональных процессов в юном организме (Бочков Н.П., 2002). Сложность консультирования беременных до 19 лет связана с тем, что чувствительность биохимического скрининга в этой группе, как показывает наш опыт, весьма низкая – всего 35,7% при пороговом значении 0,28% (см. главу VII, табл. 7.5). Поэтому мы считаем, что *беременных ранней возрастной группы следует направлять на УЗИ 2-го уровня для выявления ультразвуковых маркеров хромосомных болезней независимо от результа-*

Таблица 5.1

**Вероятность рождения ребенка с болезнью Дауна
в зависимости от возраста матери (Штильбанс И.И., 1965)**

| Возраст матери, лет | Вероятность рождения больного ребенка, % |
|------------------------|---|
| До 19 | 0,069 |
| 20–24 | 0,056 |
| 25–29 | 0,058 |
| 30–34 | 0,097 |
| 35–39 | 0,289 |
| 40 и старше | 0,810 |

тов БС. Более того, по нашему опыту, низкий уровень АФП ($<0,5$ МоМ) у беременных до 19 лет может служить достаточным основанием для их направления на инвазивную ПД, даже если риск болезни Дауна по БС ниже 0,28%.

Врачу-генетику, консультирующему беременную на предмет ПД, следует помнить, что как резко повышенное содержание АФП и ХГЧ в крови беременной, так и их значительное снижение во многих случаях являются сигналом неблагоприятного течения беременности. Повышенное содержание АФП и/или ХГЧ в крови женщин в 15–18 нед. беременности является маркером раннего развития плацентарной недостаточности и последующей гипотрофии плода (Гагарина А.В., 2004). Такие показатели указывают на необходимость направления беременной к акушеру-гинекологу для лечения угрозы прерывания беременности.

Подробную информацию о прогностической значимости результатов БС, которые необходимо иметь в виду для взвешенного медико-генетического консультирования беременных разных возрастных групп, можно получить в главе VII.

Не менее важным для медико-генетического консультирования беременных женщин, направленных на ПД, имеет и правильная оценка результатов УЗ исследования плода. Следует напомнить, что наличие отклонений в развитии плода, определяемых с помощью УЗ (так называемых УЗ-маркеров хромосомных болезней) и, конечно, выявление врожденных пороков в среднем увеличивают риск хромосомных аномалий у плода до 10–15% (Снайдерс Р.Д.М., Николаидес К.Х., 1997). Вероятность наличия у плода хромосомных болезней особенно велика при выявлении сразу нескольких

УЗ-маркеров. Подробно с УЗИ при беременности с целью ПД, а также с интерпретацией результатов УЗИ плода можно ознакомиться в главе VIII. Отметим только, что определенные отклонения в содержании МСБ при БС в сочетании с некоторыми весьма характерными УЗМ нередко позволяют уже при медико-генетическом консультировании беременной заподозрить наличие у плода той или иной хромосомной болезни (Немилова Т.К. и др., 2002). Важно, однако, помнить, что окончательный диагноз хромосомных нарушений у плода возможен только на основании цитогенетического анализа.

Некоторые УЗМ могут сигнализировать и о возможном наличии у плода моногенной патологии. Так, мекониальный илеус при УЗИ позволяет заподозрить наличие у плода муковисцидоза – самого частого моногенного заболевания (Ивашенко Т.Э., Баранов В.С., 2002). Заметная пониженная подвижность плода, хондродистрофия в сочетании с остановкой роста трубчатых костей указывают на возможность наличия у плода спинальной мышечной атрофии (Медведев М.В., Юдина Е.А., 2003) – одной из наиболее частых смертельных миопатий. Наличие вышеозначенных УЗ-маркеров может быть основанием для рекомендации ПД соответствующих моногенных болезней. Естественно, что при этом врач-генетик должен быть полностью осведомлен об особенностях проведения молекулярной диагностики этих заболеваний (см. главу X).

Нередко при наличии явных показаний к проведению инвазивной ПД врач-генетик сталкивается с решительным отказом женщины от проведения операции для получения материала плода с целью последующих лабораторных исследований. По нашему опыту, состояние женщины и ее понимание необходимости проведения инвазивной ПД в значительной мере зависят от ее исходного настроения, созданного участковым акушером-гинекологом или ее лечащим врачом. Убедительные разъяснения целесообразности ПД в таких случаях могут иметь решающее значение. Важно поэтому отметить, что беседа с беременной о возможности каких-либо заболеваний у плода должна быть в высшей степени спокойной. Необходимо сформировывать благоприятную доминанту в отношении предстоящей ПД. Более того, на приеме должны превалировать положительные моменты, связанные с важностью для самой консультируемой и ее семьи своевре-

менности ПД, особенно в случае выявления УЗ-маркеров у плода.

Важным для врача-генетика, работающего в области ПД ВНЗ, является его компетентность в оценке тяжести пороков развития у плода. Естественно, что наличие тяжелой хромосомной или моногенной патологии является достаточным основанием для рекомендации врача-генетика о прерывании беременности. Однако само по себе наличие ВПР у плода с установленным нормальным кариотипом может представить определенные сложности для заключительного медико-генетического консультирования при выдаче ответа после ПД. Так, например, расщелины верхней губы и неба в настоящее время являются хорошо корригируемым дефектом, и поэтому прерывание беременности в этом случае не рекомендуется. К корригируемым порокам относят также дефекты зарощения передней брюшной стенки и многие другие пороки развития внутренних органов и скелета (Немилова Т.К. и др., 2002). Заведомо не корригируемыми ВПР являются пороки развития головного мозга плода (анэнцефалия, микро- и гидроцефалия), спинномозговые грыжи больших размеров, наследственные формы поликистоза почек, комплекс множественных пороков развития и др. При этих ВПР, независимо от состояния кариотипа плода, рекомендуется прерывание беременности (Немилова Т.К. и др., 2002). Учитывая, однако, быстрый прогресс в области неонатальной хирургии, окончательно вопрос о корригируемости – некорригируемости того или иного порока развития должен быть согласован непосредственно с хирургом-неонатологом.

В заключение уместно напомнить, что ПД может быть проведена на разных сроках беременности (см. главу IX). Она особенно предпочтительна в I триместре (см. главу VIII). В зависимости от объема предшествующих клинических и лабораторных обследований, а также анамнестических данных могут быть рекомендованы цитогенетические исследования для уточнения кариотипа родителей, молекулярные – для уточнения природы генного заболевания и типа мутации, иммунологические – для определения титров антител к вирусам краснухи, цитомегаловирусу и т.д. Как показывает наш опыт, проведение всех перечисленных исследований во время беременности требует много времени, что может помешать проведению инвазивной ПД в оптимальные сроки. В этой связи

становится очевидной важность *проспективного медико-генетического консультирования*, т.е. консультирования еще до беременности или на ранних сроках. Именно в это время целесообразно исследовать кариотип супругов на предмет наличия сбалансированных хромосомных перестроек, что особенно важно при наличии в анамнезе двух и более выкидышей ранних сроков.

В семьях высокого риска по моногенным болезням желательно до беременности или, по крайней мере, в течение ее первых недель провести ДНК-исследование с целью определения информативности семьи, т.е. выбора метода, который будет применен для молекулярной диагностики заболевания у плода (см. главу XI).

Всем будущим родителям врач-генетик может рекомендовать анализ на носительство мажорных мутаций, сопряженных с наиболее частыми моногенными болезнями (муковисцидоз, фенилкетонурия, спинальная мышечная амиотрофия и др.). Целесообразно обсудить с беременной или с супругами, планирующими ребенка, проведение комплексных исследований для составления «Генетической карты репродуктивного здоровья», наличие которой может не только минимизировать риск рождения ребенка с ВНЗ, но и предупредить развитие наиболее частых заболеваний, осложняющих беременность и роды (см. главу XV).

Таким образом, медико-генетическое консультирование в ПД имеет свою специфику, которая сводится к следующим основным положениям:

1) необходимость оценки риска рождения больного ребенка на основании генеалогического анализа супругов и их ближайших родственников с учетом анамнестических данных и всех имеющихся результатов параклинических исследований (цитогенетических, молекулярных, серологических, иммунологических и пр.), а также результатов биохимического и УЗ-скринингов;

2) ограниченные оптимальными сроками инвазивных процедур временные возможности проведения дополнительного (цитогенетического, молекулярного и др.) обследования супружеской пары;

3) важность консультации по результатам ПД в случаях выявления наследственной (генной или хромосомной) или врожденной патологии у плода с целью оказания помощи

в принятии решения в отношении данной беременности и по прогнозу будущего потомства;

4) тщательный поиск дополнительных медико-генетических данных, которые могут повлиять на выбор правильной тактики ПД в случае неоднозначных для принятия решения результатов биохимического и УЗ-скринингов;

5) оценка возможного повреждающего действия факторов внешней среды, в том числе заболеваний матери, инфекций, лекарственных препаратов, вредных привычек родителей, промышленных и сельскохозяйственных ядов на плод.

С учетом всех перечисленных особенностей становится очевидным, что медико-генетическое консультирование как способ профилактики врожденной и наследственной патологии особенно эффективно до зачатия или на самых ранних сроках беременности, т.е. на этапе первичной профилактики.

Таким образом, *основные задачи врача-генетика в акушерско-гинекологической клинике сводятся к оценке степени риска наследственной (врожденной) патологии у плода и определению целесообразности инвазивного вмешательства для проведения соответствующих цитогенетических, молекулярно-генетических и других исследований плодного материала.*

5.2. МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ В ПРАКТИКЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Преодоление первичного или вторичного бесплодия с помощью вспомогательных репродуктивных технологий приобретает все большее распространение. Современные возможности молекулярно-генетических методов и развитие новых подходов в работе с эмбриональными клетками позволяют значительно расширить рамки вспомогательных репродуктивных технологий.

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) – это методы терапии бесплодия, при которых отдельные или все этапы зачатия и раннего развития эмбрионов осуществляются вне организма.

Вспомогательные репродуктивные технологии включают:

- экстракорпоральное оплодотворение и перенос эмбрионов в полость матки (ЭКО);
- инъекцию сперматозоида в цитоплазму ооцита (ИКСИ—Intra Cytoplasmic Sperm Injection);

- донорство спермы (ДС);
- донорство ооцитов (ДО);
- суррогатное материнство (СМ);
- доимплантационную диагностику наследственных болезней (ДД);
- искусственную инсеминацию спермой мужа (донора) (ИИСМ) (ИИСД).

Экстракорпоральное оплодотворение в мировой практике терапии бесплодия используется с 1978 г. Первый ребенок, полученный методом ЭКО, в нашей стране родился в 1987 г. в Научном центре акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН (Москва). Этому событию предшествовала длительная, интересная и весьма поучительная история, подробно изложенная в монографии Э.М. Китаева в 2004 г. (Китаев Э.М., 2004). С 1993 г. в Санкт-Петербурге в НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН работает Международный центр репродуктивной медицины. В настоящее время вспомогательные репродуктивные технологии применяются в десятках медицинских центров России. Специализированные клиники ЭКО открыты во многих крупных российских городах. Большинство из них активно сотрудничают с медико-генетическими консультациями, в редких случаях имеют врачей-генетиков в своем штате.

Все ВРТ, за исключением метода искусственной инсеминации, основаны на ЭКО. При этом в зависимости от происхождения генетического материала и условий пренатального развития плода все методы ВРТ можно подразделить на несколько групп (табл. 5.2).

Медико-генетическое консультирование в каждой группе и даже в каждом случае имеет свои особенности. Заключение и рекомендации по результатам медико-генетического обследования будут разными для супругов, если используются их половые клетки или клетки доноров. Принципиально важно выделить две группы консультируемых.

Первая группа — лица, чей генетический материал используется (мужчины, женщины-доноры и женщины, использующие при ЭКО собственную яйцеклетку).

В этой группе основной акцент необходимо делать на выявление гетерозиготного носительства генных и хромосомных мутаций. Необходимые исследования включают:

Таблица 5.2

Основные методы ВРТ

| № | Методы | Мужские половые клетки | Женские половые клетки | Вынашивание беременности |
|---|-------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
| 1 | ЭКО, ИКСИ + ЭКО | Супруг | Супруга | Мать |
| 2 | Искусственная инсеминация | Донор/супруг | Супруга | Мать |
| 3 | Донорский ооцит + ЭКО | Супруг | Донор | Мать |
| 4 | Донорский эмбрион + ЭКО | Донор | Донор | Мать |
| 5 | ЭКО + суррогатное материнство | Супруг | Супруга | Суррогатная мать |
| 6 | ЭКО + суррогатное материнство | Донор | Супруга | Суррогатная мать |
| 7 | ЭКО + суррогатное материнство | Супруг | Донор | Суррогатная мать |

- клинико-генеалогический метод;
- оценку фенотипического статуса;
- хромосомный анализ;
- молекулярно-генетический анализ носительства мутаций наиболее частых моногенных заболеваний;
- определение молекулярно-генетическими методами предрасположенности к наиболее тяжелым мультифакториальным заболеваниям.

Вторая группа – женщины, вынашивающие генетически чужеродного плода (реципиентки донорских эмбрионов и суррогатные матери).

В этой группе наибольшее значение имеют факторы, действующие на плод в течение всего внутриутробного периода. Поэтому необходимы следующие обследования:

- генетическая оценка репродуктивного статуса женщины;
- генеалогический анализ репродуктивной истории женщины;
- молекулярно-генетический анализ генов, аллельные варианты которых предрасполагают к невынашиванию беременности, фетоплацентарной недостаточности, развитию гестозов, а также к заболеваниям, часто сопутствующим или осложняющим беременность (артери-

альная гипертония, варикозная болезнь, тромбофилическая болезнь, сахарный диабет).

5.2.1. Клинико-генеалогическое исследование в практике ВРТ

Клинико-генеалогическое исследование начинается с составления родословной с использованием классических символов, принятых в медицинской генетике (Harreg P., 2003). В практике ВРТ сбор генеалогических данных проводится стандартно, с учетом сведений не менее, чем в трех поколениях. Отмечаются все заболевания родственников, но особый акцент делается на репродуктивный аспект. Уточняется, были ли проблемы с деторождением у родителей, сибсов и других ближайших родственников. Профессиональные вредности, мутагенное и тератогенное воздействие исключается не только для супругов, но и для их родителей. При консультировании доноров – мужчин и женщин – учитывается наличие собственных детей, отсутствие проблем с возникновением беременности в браке, репродуктивная история родителей и сибсов доноров.

Составление родословной семей, дети в которых появились с помощью ВРТ, а также консультирование в пренатальный период требует применения новых обозначений. Нами предлагается отмечать применение ВРТ при составлении родословной следующим образом (рис. 5.1). Примеры родословных с использованием новых символов приведены на рисунках 5.2–5.4.

Развитие методов ВРТ создает новые, не встречающиеся в естественных условиях ситуации: вынашивание ребенка, обладающего полностью генетически чужеродным материалом (донорский эмбрион или суррогатное материнство). Взаимодействие в системе мать-плацента-плод при такой искусственно созданной генетической ситуации подробно изучено в экспериментах на лабораторных млекопитающих (преимущественно на мышах), но пока мало исследовано у человека. При проведении медико-генетического консультирования в пренатальный период и постнатально все эти обстоятельства необходимо учитывать.

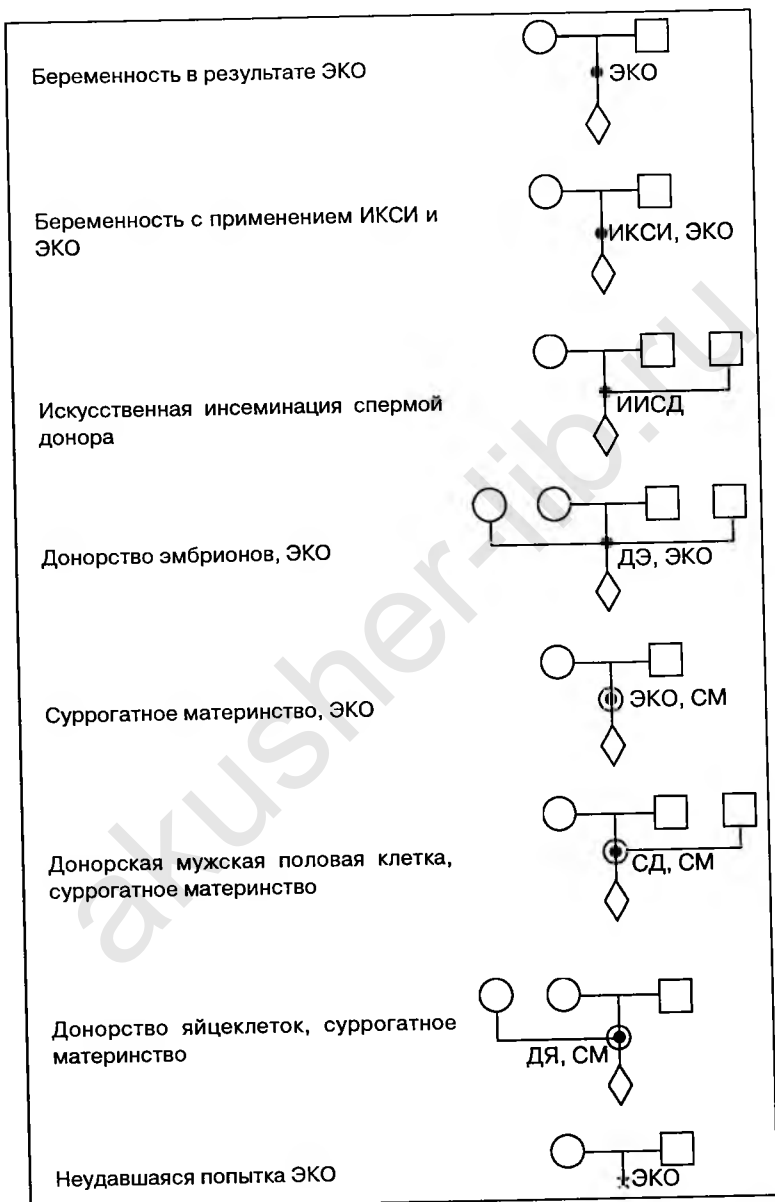


Рис. 5.1. Символы, используемые при составлении родословных семей при применении ВРТ.

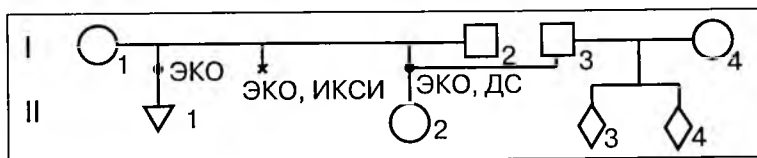


Рис. 5.2. Семья М. Бесплодие в течение 8 лет. Первая беременность (II-1), наступившая после ЭКО, закончилась спонтанным абортom на сроке 5–6 нед. Вторая попытка ЭКО в сочетании с ИКСИ – неудачная (эмбрион не прижился). При третьей попытке ЭКО использовалась сперма донора (I-3). Беременность закончилась рождением здоровой девочки (II-2).

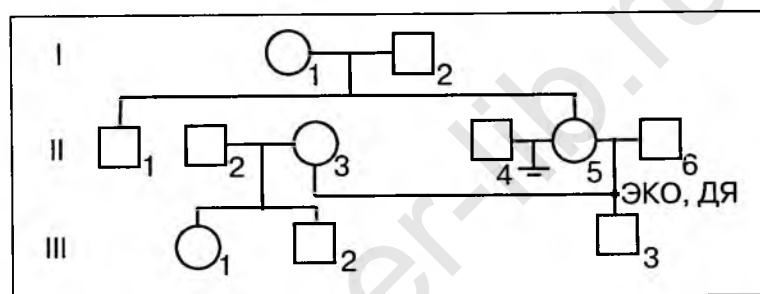


Рис. 5.3. Семья П. В первом браке у женщины (II-5) бесплодие в течение 10 лет. Во втором браке беременность также не наступала. У женщины отмечалось НМЦ, ановуляторные циклы. Семья прошла полное обследование, в том числе генетическое. У женщины при хромосомном анализе обнаружен аномальный кариотип: 45, X, таг. Семья приняла решение прибегнуть к ВРТ. При ЭКО использовалась яйцеклетка родной сестры (II-3).*

5.2.2. Оценка фенотипического статуса

В процессе медико-генетического обследования необходимо проводить оценку фенотипического статуса для исключения врожденных пороков развития (ВПР), множественных врожденных пороков развития (МВПР) и моногенных синдромов.

Обследование супругов. При обнаружении фенотипических особенностей у кого-либо из супругов проводится оценка повторного риска для потомков, в соответствии с которым определяется дальнейшая тактика, включающая методы доимплантационной или традиционной ПД. В крайнем случае, рекомендуется использование генетического материала доноров.

* Родился здоровый мальчик (III-3).

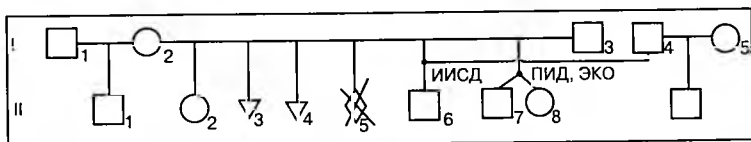


Рис. 5.4. Семья Р. Супруга (1-2) от первого брака имеет здорового ребенка (II-1). В настоящем браке первый ребенок (II-2) родился с синдромом Дауна. Следующие две беременности самопроизвольно прервались на раннем сроке. При четвертой беременности в этом же браке была проведена пренатальная диагностика, обнаружена трисомия по 21 хромосоме, беременность прервана на сроке 12 нед. При следующей беременности использовалась искусственная инсеминация спермой донора (I-4) – родился здоровый мальчик (II-6). При последующей беременности в программу ВРТ была включена предимплантационная диагностика при использовании спермы мужа (I-3). Произведена подсадка эмбрионов, родились здоровые дети (II-7 и 8).

Обследование доноров. Требования к фенотипическим особенностям доноров значительно строже, чем при обследовании супругов. Абсолютным противопоказанием для участия в программе донорства являются все ВПР, и тем более МВПР. При осмотре кандидатов в доноры важно обращать внимание на вероятное доклиническое проявление генных заболеваний или неполную пенетрантность некоторых патологических состояний. Соответственно, отводом будут служить повышенное количество пятен кофейного цвета на коже (нейрофиброматоз?), гиперэластичность кожи и гипермобильность суставов (наследственные коллагенопатии?), асимметрия всего тела или отдельных частей, участки депигментации и белая прядь волос (синдром Вааденбурга?), наличие диастемы в сочетании с готическим небом (неполная расщелина неба?) и т.д.

5.2.3. Цитогенетический анализ

Кариотипирование родителей. В клинической генетике бесплодие неясного генеза, наличие двух и более выкидышей раннего срока являются показаниями для кариотипирования супругов. Эти же причины вынуждают людей обращаться за помощью в центры экстракорпорального оплодотворения. Соответственно, цитогенетический анализ может быть рекомендован большинству супругов, вынужденных прибегнуть к ВРТ. Наиболее частой генетической причиной неудач при применении ВРТ являются сбалансированные транслокации

у одного из родителей. Развитие методов доимплантационной диагностики предоставляет новые возможности семейным парам при наличии аномалий кариотипа у одного из супругов иметь собственных здоровых детей. В наиболее сложных ситуациях всегда существует возможность использования донорских клеток или доимплантационная диагностика с последующим отбором генетически нормальных эмбрионов. Необходимо учитывать, что нарушения сперматогенеза у мужчин часто являются результатом хромосомных аномалий, что увеличивает риск нарушений хромосомного аппарата у потомства. Различные аномалии кариотипа наиболее часто встречаются у мужчин, нуждающихся в интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ). Соответственно, цитогенетический анализ необходим, чтобы свести возможные риски для потомства к минимуму.

Своевременное выявление хромосомных аномалий у лиц, планирующих экстракорпоральное оплодотворение, особенно в сочетании с другими ВРТ, позволяет подобрать оптимальный метод решения проблемы бесплодия и сократить число репродуктивных потерь.

Кариотипирование доноров. К кариотипированию доноров половых клеток предъявляются более строгие требования, чем в обычной практике медико-генетического консультирования семейных пар. Безусловным противопоказанием к донорству являются численные и структурные аномалии кариотипа. Противопоказаниями к донорству половых клеток являются особенности кариотипа, в обычной практике расценивающиеся как вариант нормы (отсутствие коротких плеч или увеличенные/двойные спутники и спутничные нити, а также повышенная частота ассоциаций акроцентрических хромосом, увеличенные блоки прицентромерного гетерохроматина аутосом и длинного плеча Y-хромосомы, инверсия прицентромерного гетерохроматина хромосомы 9).

Кариотипирование плодов. Пренатальная цитогенетическая диагностика (традиционная или доимплантационная) проводится при наличии стандартных показаний или при повышенном риске хромосомных аномалий у плода в конкретной семье (см. главу X).

Кариотипирование плода показано во всех случаях, независимо от способа наступления беременности, если возраст

матери 35 и более лет. Женщинам этой же возрастной группы, беременность у которых наступила в результате ЭКО с использованием донорской яйцеклетки (согласно регламентирующим документам возраст анонимных доноров — до 35 лет), инвазивная диагностика с целью кариотипирования плода назначается только при наличии других показаний (отклонения биохимических маркеров, выявление УЗ-маркеров и ВПР).

Кариотипирование абортного материала. В случае прерывания беременности, наступившей в результате ЭКО, желательно проводить цитогенетическое исследование плодного материала для уточнения причин выкидыша и определения дальнейшей тактики ведения семьи.

5.2.4. Молекулярно-генетический анализ

Возможности новых ВРТ и интенсивное развитие методов молекулярной диагностики позволяют перейти от вероятностного прогнозирования здоровья будущего ребенка к оценкам, основанным на конкретных рисках. С учетом ситуации, вынудившей семью прибегнуть к помощи ВРТ, их сложности, высокой себестоимости и трудоемкости, требования к качеству медико-генетического консультирования и точности лабораторных методов исследований существенно возрастают. Все лица, чьи гаметы предполагается использовать в программах ВРТ, должны обследоваться на носительство мажорных мутаций часто встречающихся заболеваний (муковисцидоз, фенилкетонурия, аденогенитальный синдром, нейросенсорная тугоухость, спинальная мышечная атрофия). Представителям определенных национальностей и этнических групп, у которых частота встречаемости других моногенных заболеваний особенно высока (периодическая болезнь у армян, талассемия у жителей Средиземноморья, болезнь Тея-Сакса у евреев ашкенази) предлагается ДНК-диагностика носительства мутаций соответствующих генов.

Обследование доноров. Носительство мажорных мутаций у кандидатов в доноры половых клеток является абсолютным основанием для их отвода от участия в программе донорства. По результатам обследования этому человеку должны быть даны рекомендации о необходимости генетических исследований при планировании деторождения в собственной семье.

Обследование супругов. Мужчинам при азоо- или олигоспермии неясной этиологии рекомендуется кариотипирование, а также молекулярно-генетический анализ микроделеций в Y-хромосоме. Причиной некоторых форм обструктивной азоо- или олигоспермии могут быть мутации в гене CFTR, которые повышают риск рождения детей, больных муковисцидозом (Иващенко Т.Э., Баранов В.С., 2002).

Важную роль в невынашивании беременности могут играть гены детоксикации, определяющие реакцию организма на воздействие химических факторов внешней среды (ксенобиотиков) (Баранов В.С., 2004). Установлено, что определенные сочетания функционально неблагоприятных вариантов генов системы детоксикации (GSTM1, GSTT1, GSTP1, NAT2), генов обмена фолиевой кислоты и гомоцистеина (MTHFR, MTRR), а также генов главного комплекса гистосовместимости (HLA) существенно увеличивают вероятность самопроизвольного прерывания беременности (Баранов В.С., 2003). Дополнительно можно определить предрасположенность к наиболее тяжелым мультифакториальным заболеваниям. Исследования на гетерозиготное носительство мутаций ряда наиболее частых моногенных заболеваний позволяют выявить супружеские пары с повышенным риском рождения детей с ВНЗ. В зависимости от результатов ДНК-анализа и типа заболевания супругам может быть предложена пренатальная диагностика (в том числе и доимплантационная), либо использование донорских клеток.

5.2.5. Особенности медико-генетического консультирования

Практически всем семьям, нуждающимся в том или другом варианте ВРТ, требуется медико-генетическое консультирование. Прежде всего, это относится к супружеским парам, которые имеют такие особенности анамнеза, как бесплодие неясного генеза, два и более случая самопроизвольного прерывания беременности до 12 нед., наличие детей с врожденными пороками развития или другой наследственной патологией. Лица с такими особенностями кариотипа, как сбалансированные транслокации, аномалии в системе половых хромосом, маркерные хромосомы, а также гетерозиготные носители генных мутаций нуждаются в подробном медико-генетическом заключении с указанием рекомендаций о диагнос-

тических мероприятиях при беременности. Перед назначением доимплантационной диагностики необходимо составить специальное медико-генетическое заключение с расчетом вероятности здорового потомства.

Подготовка супружеской пары к беременности с применением вспомогательных репродуктивных технологий, включая донорские половые клетки или донорские эмбрионы, также должна включать в себя медико-генетическое консультирование. Врач-генетик должен объяснить будущим родителям целесообразность подбора донора не только по фенотипическим данным и сходству с родителями, но и по результатам генетического тестирования и клинко-генеалогическим данным, исключающим повышенный риск мультифакториальных заболеваний. Медицинским центрам, использующим донорские клетки в практике ВРТ, в целях прогноза потомства и оценки состояния здоровья ребенка и его будущих поколений необходимо предоставлять юридическим родителям **«Генетический паспорт донора половых клеток»**.

Будущие юридические родители должны получить информацию о невозможности гарантии абсолютного здоровья ребенка, о популяционном риске моногенных, хромосомных и мультифакториальных заболеваний и о вероятности возникновения у плода врожденных пороков развития. Возможности доимплантационной и стандартной постимплантационной пренатальной диагностики должны быть оговорены заранее и при необходимости включены в программу ведения беременности. Врач должен подготовить супругов не только к получению и сохранению беременности после ВРТ, но и информировать их о необходимости при наличии соответствующих показаний полного обследования плода во время беременности, в том числе с использованием инвазивных вмешательств. Всем женщинам старше 35 лет, в том числе с беременностями после ЭКО, рекомендуется пренатальное кариотипирование плода. Женщинам этой же возрастной группы, использовавшим донорскую яйцеклетку (если возраст донора менее 35 лет), инвазивная диагностика назначается только при наличии других показаний – по результатам УЗИ и биохимического скрининга I и II триместров.

Перспективное консультирование должно включать в себя объяснение родителям важности неутаивания информа-

ции о применении ВРТ от будущего ребенка, учитывая вероятность обращения его самого и потомков за медико-генетической консультацией.

Практикующим врачам-генетикам, с учетом развития и довольно широкого использования методов ВРТ, необходимо при сборе генеалогических данных наряду с 10% поправкой на ложное отцовство, учитывать эмпирическую вероятность рождения ребенка в семье с использованием донорских гамет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суть МГК заключается в определении прогноза рождения ребенка с наследственной и врожденной патологией, в объяснении вероятности неблагоприятного исхода беременности и в помощи женщине (семье) в принятии решения о деторождении. Основная цель МГК заключается в разработке оптимального алгоритма профилактики наследственной и врожденной патологии. Специфика и особенности МГК при беременности позволяют его трактовать как «репродуктивное консультирование».

Основные задачи МГК включают: установление точного диагноза наследственного заболевания (1); определение типа наследования патологии в данной семье (2); составление прогноза рождения ребенка с наследственным заболеванием или врожденной патологией не наследственного происхождения (3); расчет повторного риска рождения ребенка с наследственной патологией (4); информацию о вероятности рождения ребенка с мультифакториальным заболеванием в семье высокого риска (5); определение наиболее эффективного способа профилактики (6); помощь семье в принятии правильного решения (7); направление на инвазивную ПД с последующим цитогенетическим, молекулярным и биохимическим исследованием плодного материала (8); пропаганду медико-генетических знаний среди врачей и населения (9). Важным аспектом МГК является составление «Генетической карты репродуктивного здоровья», наличие которой может не только минимизировать риск рождения больного ребенка с ВНЗ, но и предупредить развитие наиболее частых заболеваний, осложняющих беременность и роды. Выделены следующие прямые показания для направления беременной к врачу-генетику акушерской клиники: наличие точно установленной или

предполагаемой хромосомной болезни в семье у кого-либо из супругов или других членов семьи (1); рождение ребенка с хромосомной болезнью или прерывание предыдущей беременности в связи с установленной в результате ПД хромосомной патологией у плода (2); хромосомные перестройки у супругов или членов их семей (3); моногенные заболевания у супругов, их детей, у других членов семьи (4); МВПР или врожденная умственная неполноценность у кого-либо из супругов, их детей и других членов семьи (5); воздействие возможных тератогенов (мутагенов) до или в течение первых трех месяцев беременности (6); патологические отклонения результатов биохимического скрининга маркерных сывороточных белков (7); ультразвуковые маркеры хромосомных и генных болезней у плода (8); возраст беременной 35 лет и старше (9). Кратко рассмотрены некоторые сложности, возникающие при интерпретации этих показаний врачом-генетиком, проводящим МГК в условиях акушерской клиники.

МГК, в том числе и пренатальное, в условиях работы клиники, использующей вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) с целью лечения бесплодия, имеет ряд особенностей. Кратко рассмотрены существующие методы ВРТ, особенности МГК в зависимости от того, чьи и какие половые клетки используются для ЭКО, клинико-генеалогические исследования в практике применения ВРТ, особенности медико-генетического обследования супругов и доноров, включающие цитогенетический и молекулярно-генетический анализ. Предложен собственный вариант написания родословных для МГК в условиях применения ВРТ.

ГЛАВА VI. СКРИНИРУЮЩИЕ ПРОГРАММЫ В ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

6.1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СКРИНИРУЮЩИХ ТЕСТАХ

Термин «скрининг» означает «просеивание», «сортировка». Скрининговые тесты часто применяются в медицинской практике. В качестве теста выбирают достаточно быстрое и экономичное исследование, которое пригодно для массового применения. В отобранной с помощью скрининга группе высокого риска проводят специальные лабораторные исследования, результатом которых может быть подтверждение или снятие диагноза соответствующего заболевания (Бочков Н.П., 2004). Необходимо, однако, помнить, что сам по себе скрининг не является диагностическим тестом, а служит только для отбора части населения с повышенным риском определенной патологии. Скрининг считается *массовым*, если им охвачено не менее 80% из обследуемой части населения. Если количество участвующих в скрининговом исследовании людей не достигает этой величины, то скрининг называется *селективным* (выборочным). Согласно рекомендациям ВОЗ 1968 г. (Cargera J.M., Di Renzo G.C., 1993), *генетический скрининг*, т.е. скрининг, направленный на раннее выявление и профилактику наследственных болезней, должен удовлетворять следующим требованиям:

- 1) генетическое скринирование является добровольным;
- 2) пациент должен получить всю информацию о целях и возможных результатах скрининга до начала исследования;
- 3) результаты скрининга являются конфиденциальной информацией, т.е. не обсуждаются с работодателями, представителями страховых компаний и т.д.;
- 4) результаты генетического скрининга интерпретируются врачом-генетиком;

Таблица 6.1

Возможные варианты результатов скрининга

| Результат скрининга | Заболевание есть | Заболевания нет |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Положительный | Истинноположительные значения (ИП) | Ложноположительные значения (ЛП) |
| Отрицательный | Ложноотрицательные значения (ЛО) | Истинноотрицательные значения (ИО) |

5) если лечение и профилактика заболевания возможны — необходимо их начать немедленно после получения положительных результатов скрининга;

6) скрининг новорожденных должен быть обязательным и бесплатным, если ранняя диагностика позволяет не допустить развития заболевания.

При проведении скрининга необходимо выбрать *пороговое значение* (cut off) маркера, условно разделяющее нормальные уровни (отрицательные результаты) и уровни, ассоциированные с патологией, т.е. положительные результаты. В этих терминах возможны следующие варианты ответов (табл. 6.1).

Для сравнения эффективности различных маркеров введены следующие понятия:

Выявляемость или чувствительность (detection rate) = $\text{ИП}/(\text{ИП}+\text{ЛО}) \cdot 100\%$.

Эффективность (efficiency) = $\text{ИП}/(\text{ИП}+\text{ЛО}+\text{ЛП}+\text{ИО}) \cdot 100\%$.

Специфичность (specificity) = $\text{ИО}/(\text{ЛП}+\text{ИО}) \cdot 100\%$,

где ИП — истинноположительный результат, ЛО — ложноотрицательный результат, ИО — истинноотрицательный результат, ЛП — ложноположительный.

Специфичность — способность теста корректно идентифицировать тех, кто здоров (вероятность отрицательных результатов там, где нет болезни).

Положительная предсказательная величина (positive predictive power) = $\text{ИП}/(\text{ИП}+\text{ЛП}) \cdot 100\%$.

Отрицательная предсказательная величина (negative predictive power) = $\text{ИО}/(\text{ИО}+\text{ЛО}) \cdot 100\%$.

Величина *ложноположительных результатов* (ЛПР) (false positive results) характеризует размер группы пациентов высокого риска по наличию болезни и равна следующей величине:

$\text{ЛПР} = \text{ЛП}/(\text{ИП}+\text{ЛП}+\text{ИО}+\text{ЛО}) \cdot 100\%$.

Задача пренатального генетического скрининга – идентификация женщин групп высокого риска по рождению детей с ВПР и наследственными болезнями, требующих более детального анализа состояния плода с помощью специальных лабораторных методов исследования.

Основные скринирующие программы в ПД включают:

- 1) ультразвуковой скрининг;
- 2) биохимический скрининг маркерных белков в сыворотке крови беременной;
- 3) цитогенетический скрининг;
- 4) молекулярный скрининг;
- 5) иммунологический скрининг.

Еще одним вариантом генетического скрининга является медико-генетическое консультирование, которое в идеальной ситуации относится ко всем беременным и всем супружеским парам, планирующим ребенка. Этот скрининг, однако, сам по себе не основан на использовании специальных лабораторных методов исследований, хотя нередко суммирует результаты других вариантов скрининга (см. главу V).

6.2. УЛЬТРАЗВУКОВОЙ СКРИНИНГ (УЗС) И УЛЬТРАЗВУКОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (УЗИ)

В настоящее время УЗС является наиболее популярным вариантом скрининга для отбора женщин групп высокого риска по рождению детей с ВНЗ. *Согласно существующим рекомендациям (Приказ МЗ РФ от 28.12.2000 №457) УЗС при беременности проводится трижды (10–14; 18–22 и 30–32 нед. беременности) и в зависимости от углубленности анализа может быть 1-го, 2-го и 3-го уровня.*

УЗИ – основной прямой неинвазивный метод ПД, высоко эффективен для выявления врожденных пороков развития плода. По данным ВОЗ – безвреден для плода и матери. Тем не менее, считается, что УЗИ не следует злоупотреблять. Их должно быть ровно столько, сколько необходимо (принцип «ALARA» – as low as reasonably achievable) (см. главу V).

УЗИ в адекватные сроки и в соответствии с существующими протоколами позволяет выявить 80–98% плодов с анатомическими пороками.

Эффективность УЗИ во многом зависит от разрешающей способности ультразвукового аппарата, опыта специалиста

и уровня обследования. Подробно с применением УЗИ в ПД можно ознакомиться в главе VIII.

6.3. БИОХИМИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ (БС)

Анализ эмбриональных (маркерных) сывороточных белков в крови беременной – распространенный вариант БС, широко применяемый в ПД для выявления женщин групп высокого риска по рождению детей с хромосомными болезнями, прежде всего с синдромом Дауна и с некоторыми пороками развития, главным образом, с дефектами заращения невральной трубки.

БС проводится как в I, так и во II триместрах беременности. Основными маркерными сывороточными белками (МСБ) в крови матери в настоящее время считаются альфа-фетопроtein (АФП), хориальный гонадотропин человека (ХГЧ), свободный (неконъюгированный) эстриол (НЭ) (II триместр), ассоциированный с беременностью белок плазмы А (РАРР-А) и свободная β -субъединица хорионического гонадотропина человека (I триместр). *Все МСБ являются эмбрионспецифичными, т.е. они продуцируются клетками самого плода или плаценты и поступают в материнский кровоток.* Их концентрация в сыворотке крови матери меняется в зависимости от срока беременности и от состояния плода. Алгоритмы БС в I и во II триместрах, динамика содержания МСБ в крови женщины на разных сроках беременности, условия проведения БС, особенности обработки и интерпретации полученных результатов подробно рассмотрены в главе VII.

6.4. ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ (ЦС)

Исходя из непреложных фактов, что исключительное большинство геномных мутаций возникают *de novo*, каждую беременность можно рассматривать как ситуацию риска рождения ребенка с хромосомной болезнью. Трудоемкость цитогенетических методов делает массовое пренатальное кариотипирование нереальным, а с учетом определенного, хоть и небольшого, риска инвазивных манипуляций с целью получения плодного материала – вредным.

Фундаментальной основой цитогенетического скрининга является определение риска хромосомной патологии у плода в зависимости от возраста беременной и семейного репродуктивного анамнеза. Последний включает наличие у супружеской па-

ры ребенка с хромосомной болезнью или множественными пороками развития, а также носительство хромосомной аберрации одним из супругов. *Основной целью цитогенетического скрининга является поиск супружеских пар, а priori имеющих повышенный риск образования несбалансированных гамет и зигот.* В осуществлении этого вида пренатального скрининга могут и должны принимать участие врачи любой специализации, однако ведущая роль в расчете индивидуального риска принадлежит врачу-генетику.

Цитогенетический скрининг вместе с биохимическим и ультразвуковым представляют триаду программ, имеющих непосредственное отношение к формированию групп высокого риска хромосомных болезней у плода. Однако, отводя ведущую роль биохимическому и ультразвуковому скринингу, нельзя практически полностью игнорировать значимость цитогенетического скрининга как одного из самостоятельных направлений профилактики хромосомной патологии. Вместе с тем, по конечным целям скринирующего исследования — расчет индивидуального риска рождения ребенка с хромосомной болезнью — цитогенетический скрининг принципиально не отличается от ультразвукового или биохимического. Его специфика заключается в том, что вероятность хромосомной патологии у плода рассчитывается независимо от данных о его состоянии, тогда как риск при биохимическом и ультразвуковом скрининге исчисляется по результатам биохимических и биофизических исследований при настоящей беременности. ЦС может осуществляться в любой срок беременности и даже до ее наступления. Однако, принимая во внимание пониженную жизнеспособность плодов с хромосомным дисбалансом, очевидно, что эффективность цитогенетического скрининга будет снижаться с увеличением срока беременности.

Следует отметить, что понятие «цитогенетический пренатальный скрининг» зачастую подменяется понятием «цитогенетическая пренатальная диагностика». Между тем, это далеко не синонимы. Так, если цель скрининга — это определение индивидуального риска хромосомной патологии у плода, то цитогенетическая пренатальная диагностика — это часть комплекса лабораторно-диагностических исследований, сопровождающих инвазивные внутриматочные вмешательства с целью получения плодного материала. Строго говоря, цито-

генетическая ПД — это кариотипирование плода в разных группах риска, нуждающихся в инвазивной ПД. В подавляющем большинстве случаев кариотипирование плода проводится по показаниям, определенным по результатам трех программ пренатального скрининга — цитогенетического, ультразвукового и биохимического.

Как уже отмечалось, итогом цитогенетического скрининга является формирование групп высокого риска по рождению ребенка с хромосомной патологией на основании возраста беременной и семейного репродуктивного анамнеза. Последний включает учет таких данных, как *наличие у супружеской пары ребенка (плода) с хромосомной болезнью или множественными пороками развития, а также аномалии кариотипа у одного (или обоих) супругов*. Именно эти группы супружеских пар имеют высокий удельный вес в структуре обращаемости на ПД, а накопленные к настоящему времени результаты убедительно свидетельствуют о том, что частота выявления аномальных кариотипов в этих группах существенно превышает популяционную. Подробнее о группах, имеющих повышенный риск рождения ребенка с хромосомной болезнью, см. главу X.

Таким образом, *в зависимости от возраста, наличия хромосомных перестроек, предшествующего ребенка с МВПР или с хромосомными болезнями женщина автоматически попадает в группу высокого риска хромосомной патологии у плода и незамедлительно подлежит направлению на ПД с целью кариотипирования плода*. Принципы, методы и алгоритмы ПД хромосомных болезней подробно рассмотрены в главе X.

6.5. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СКРИНИНГ (МС)

МС представляет собой часть более обширной программы скрининга наследственной моногенной патологии, которая встречается примерно у 1% всех новорожденных. В настоящее время МС применяется только для некоторых заболеваний, для которых известны часто встречающиеся (мажорные) мутации. В некоторых развитых странах Западной Европы, Америки, Израиле уже проводится МС некоторых особенно частых, социально значимых моногенных болезней, таких как муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна, талассемия, болезни «накопления». К кандидатам на МС в РФ можно отнести

муковисцидоз, фенилкетонурию, адреногенитальный синдром, спинальную мышечную атрофию (болезнь Верднига—Гоффмана). Ввиду выраженной этнической неоднородности населения РФ, существенных национальных и популяционных колебаний частот и спектра мажорных мутаций и, конечно, достаточно высокой себестоимости, МС этих заболеваний не проводится. Такое тестирование, однако, вполне доступно в ряде лабораторий и МГЦ РФ по желанию супругов. Оно рекомендуется до беременности при составлении «Генетической карты репродуктивного здоровья» (см. главу XV).

Важно отметить, что молекулярное тестирование, безусловно, показано в семьях высокого риска моногенных болезней. Оно также нередко проводится с целью уточнения клинического диагноза при подозрении у больного ребенка той или иной моногенной патологии. Принципы и методы молекулярной диагностики, особенности молекулярной диагностики наиболее частых тяжелых генных болезней, а также список моногенных болезней, диагностируемых в России и в Санкт-Петербурге, приведены в главе XI.

6.6. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ (ИС)

Иммунологическим называется скрининг беременных на наличие ряда инфекций, потенциально нарушающих внутриутробное развитие плода. К таковым относятся: вирус краснухи, простого герпеса, цитомегаловирус, вирус ветряной оспы, возбудители токсоплазмоза. Присутствие в крови IgG антител при отсутствии IgM антител указывает на то, что женщина перенесла данное заболевание до беременности. Высокие титры IgG антител при наличии IgM антител указывают на текущую инфекцию. Применение современных молекулярных тест-систем для детекции возбудителей перечисленных инфекций методом ПЦР в сочетании с классическими серологическими и бактериологическими методами позволяет достаточно надежно проводить иммунологический скрининг не только на ранних сроках беременности, но и в преконцепционном периоде.

Важнейшим составляющим ИС является тестирование Rh-принадлежности матери. Проблема Rh-конфликта матери и плода — одна из серьезных проблем современного акушерства. Возникающая вследствие такого конфликта гемолитическая болезнь — грозное осложнение беременности, кото-

рое можно предотвратить при соблюдении следующих условий: своевременное определение Rh-принадлежности беременной (супругов) (1), а при отрицательной резус-принадлежности крови беременной – определение наличия антирезусных антител в ее крови (2). При необходимости инвазивной пренатальной диагностики хромосомной патологии плода у резус-отрицательной женщины вопрос о выборе оптимального срока беременности для проведения манипуляции решается индивидуально с учетом ее акушерского анамнеза, степени выраженности гемолитической болезни плода при предыдущей беременности и наличия титра антител к резус-фактору. Особенности проведения ПД у беременных с резус-отрицательной принадлежностью рассмотрены в главе IX.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Любой скрининг не является диагностическим тестом, а служит только для отбора части населения с повышенным риском выявления определенной патологии.

Решающее значение для ПД имеет генетический скрининг, направленный на раннее выявление и профилактику наследственных и врожденных болезней у плода. Основная задача пренатального генетического скрининга – идентификация женщин групп высокого риска по рождению детей с ВПР и наследственными болезнями, требующих более детального анализа состояния плода с помощью специальных лабораторных методов исследования. Основные скринирующие программы в ПД включают: ультразвуковой скрининг плода – УЗС (1), биохимический скрининг маркерных белков – БС (2), цитогенетический скрининг – ЦС (3), молекулярный скрининг – МС (4), иммунологический скрининг – ИС (5). В качестве интегрирующей программы генетического скрининга в ПД можно рассматривать и медико-генетическое консультирование, особенности которого при беременности рассмотрены в главе V.

УЗС является наиболее популярным вариантом скрининга для изучения состояния плода на разных сроках беременности, для отбора женщин групп высокого риска по рождению детей с ВНЗ, для выявления патологии беременности и выполнения инвазивной ПД с целью забора плодного материала. УЗС при беременности проводится, по крайней мере, трижды (10–14; 18–22 и 30–32 нед. беременности). В зависи-

мости от поставленных целей и задач УЗИ может быть 1-го, 2-го и 3-го уровней (см. главу VIII).

БС основан на анализе эмбриональных сывороточных белков в сыворотке крови женщины в I, так и во II триместрах беременности. БС широко применяется для выявления женщин групп высокого риска по рождению детей с хромосомными болезнями и с некоторыми пороками развития. Разработаны компьютеризированные варианты оценки риска по результатам БС. Особенно перспективным представляется комбинированный УЗ и БС в I триместре беременности (см. главу VII).

ЦС, основу которого составляет кариотипирование плода с целью диагностики хромосомных болезней, распространяется на следующие основные группы высокого риска: 1) беременные в возрасте 35 лет и старше; 2) женщины, ранее родившие ребенка с МВПР или с хромосомной болезнью; 3) структурные или численные аномалии кариотипа у одного из супругов (см. главу X).

МС представляет собой часть программы скрининга наследственной моногенной патологии, которая встречается у 1% всех новорожденных (глава XI).

ИС включает тестирование Rh-принадлежности матери и наличие ряда инфекций, потенциально опасных для внутриутробного развития плода. Разработаны оптимальные алгоритмы проведения ПД у женщин с отрицательным резусом, относящихся к группам высокого риска врожденной и наследственной патологии (глава IX).

ГЛАВА VII. БИОХИМИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ МАРКЕРНЫХ БЕЛКОВ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

7.1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ И КРАТКАЯ ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА

Биохимический скрининг (БС) врожденных пороков развития плода является одним из достаточно давних вариантов генетического скрининга (см. главу VI). Началом БС следует считать публикацию первых данных об ассоциации уровня α -фетопротеина (АФП) в сыворотке крови беременной с наличием анэнцефалии у плода (Brock D.H.J., Sutcliffe R.G., 1972). Поскольку дефекты зародка нервной трубки (ДЗНТ) плода в Великобритании встречались довольно часто, 18 медицинских центров провели совместные исследования и на большом статистическом материале (458 случаев анэнцефалии и т.д.) подтвердили высокую корреляцию уровня АФП в сыворотке крови беременной женщины и наличия ДЗНТ у плода (UK collaborative study, 1977). При недостаточной чувствительности ультразвукового скрининга в 70–80-е годы прошлого века диагностическим тестом, подтверждающим наличие ДЗНТ у плода, явилось определение уровня АФП и наличия специфической для нервной ткани изоформы ацетилхолинэстеразы в амниотической жидкости, полученной путем амниоцентеза (Brock D.H.J. et al., 1973; Кашеева Т.К. и др., 1997а).

Исследование белков сыворотки крови матери для оценки состояния плода было признано удобным скрининговым тестом. Оно явилось стимулом широкомасштабных исследований по поиску других эмбриональных белков в сыворотке крови беременной и их ассоциации с наиболее частыми патологическими состояниями плода. В 1984 г. появилась работа, в которой впервые было показано снижение содержания АФП при синдроме Дауна (СД) у плода (Merkatz I.R. et al., 1984). В том же году этот тест был предложен в качестве скри-

нинга на СД у плода. Был разработан алгоритм расчета риска хромосомной патологии у плода с учетом возраста матери и содержания АФП (Cuckle H. et al., 1984; Tabor A. et al., 1987). Позже были обнаружены и другие эмбриональные сывороточные маркеры, концентрация которых в крови беременной изменялась при наличии СД у плода (Wald N.J. et al., 1988a, b). Наиболее существенные отклонения от нормы были обнаружены для хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) и неконъюгированного эстриола (НЭ) (Bogart M.H. et al., 1987; Canick J.A. et al., 1988). С 1992 г. проспективное исследование сыворотки крови беременных с целью выявления СД у плода нашло практическое применение в ряде медицинских центров Европы (Haddow J.E. et al., 1992; Wald N.J. et al., 1992a; Herrou M. et al., 1992).

В нашей стране первые результаты селективного скрининга на содержание АФП появились в 1988 г. и были получены с помощью тест-системы иммуноферментного анализа (ИФА) «Диаплюс» (Дубинина И.В., 1990; Горбунова В.Н. и др., 1991). В 1989 г. в Ленинграде был введен массовый скрининг на содержание АФП для выявления группы высокого риска по наличию ДЗНТ и дефекта передней брюшной стенки (ДПБС) у плода (Вахарловский В.Г. и др., 1995). Первоначально БС в Санкт-Петербурге проводился только в лаборатории пренатальной диагностики наследственных болезней НИИАГ АМН СССР. Впоследствии и вплоть до настоящего времени основным местом проведения массового БС стала лаборатория биохимии Городского медико-генетического центра, ныне Диагностический центр (медико-генетический). С 1993 г. в Санкт-Петербурге проводился *селективный биохимический скрининг* хромосомной патологии плода с применением двойного теста – определения содержания АФП и ХГЧ. *Массовый биохимический скрининг* проводится с 1997 г. после появления качественных отечественных тест-систем («Алкор Био», Санкт-Петербург). С 2000 г. ежегодно обследовалось более 87% беременных города (Kascheeva T. et al., 2003).

В 2003–2004 гг. в НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН были разработаны нормативы и внедрен селективный скрининг в I триместре беременности, включающий исследование уровня ассоциированного с беременностью белка А (РАРР-А), свободной β -субъединицы хорионического гонадотропина че-

ловека (св. β -ХГЧ) и ультразвуковое определение толщины воротникового пространства (ТВП), наличия и длины носовой кости (НК) плода с последующим расчетом комбинированного риска с учетом всех показателей, анамнеза и возраста матери.

7.2. БИОХИМИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ВО II ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ

БС во II триместре беременности является исторически более ранним. До сих пор он широко применяется в различных центрах ПД во всем мире и в нашей стране.

7.2.1. Структура, метаболизм и свойства сывороточных маркеров

К маркерным сывороточным белкам (МСБ) в крови матери, отклонения которых позволяют сформировать группу беременных высокого риска по рождению детей с хромосомными нарушениями и/или ВПР во II триместре, относятся альфа-фетопротеин (АФП), хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), свободная α - или β -субъединицы ХГЧ, свободный (неконъюгированный) эстриол (НЭ), трофобластический β -гликопротеин (ТБГ или SP1), ингибин А (ингА) и некоторые другие.

α -фетопротеин (АФП) — основной компонент фетальной сыворотки на ранних сроках беременности, гликопротеин с молекулярной массой 69 кДа. Вырабатывается желточным мешком и печенью плода, экскретируется с мочой в амниотическую жидкость, откуда проникает в кровь матери через плаценту или плодные оболочки. АФП в крови матери определяется с 5–6-й недели беременности, и его уровень постоянно растет. Два пути поступления АФП в кровоток беременной не дают возможности определить конкретную причину повышения его уровня у матери. Оно может быть следствием увеличения диффузии АФП через плаценту, либо результатом роста его концентрации в амниотической жидкости (АЖ) с последующим активным всасыванием в материнскую кровь через плодные оболочки. После 30–32-й недели содержание АФП в сыворотке крови матери падает до 50% от максимума (Кулиев А.М. и др., 1990). Постоянное увеличение уровня АФП в крови матери при снижении его концентрации в АЖ и крови плода объясняется быстрым ростом плода и увеличе-

нием площади контакта плаценты и плодных оболочек с материнскими тканями. Период полураспада АФП в сыворотке крови и АЖ составляет около 3–5 сут. Это свидетельствует об относительной стабильности АФП в организме (Parr Z., 1990).

Считается, что основная функция АФП заключается в поддержании онкотического давления внутри кровеносных сосудов плода. Предполагается также, что АФП играет иммуносупрессорную роль и препятствует отторжению плодного яйца материнским организмом (Haddow J.E. et al., 1992). Возможно, АФП играет роль преальбумина, так как его молекула имеет 38% гомологии с альбумином крови взрослого. АФП исчезает из крови новорожденных в течение нескольких недель. Однако в концентрации до 200 мкг/л АФП встречается у некоторых детей в возрасте до 1 года (Masseyeff R., 1975). Вне беременности в норме в крови взрослого АФП не обнаруживается. Примерно у 2–5% населения существует генетически обусловленная крайне низкая продукция АФП во взрослом состоянии (Ruoslahti E., Seppala M., 1972). Существенное повышение содержания АФП у взрослых указывает на наличие новообразований, прежде всего, опухолей печени (Татаринов Ю.С., 1964; Abelev G.I. et al., 1967).

Значительное повышение (в 5–10 раз) уровня АФП в сыворотке крови беременной во II триместре с высокой степенью вероятности указывает на наличие дефектов зарощения невральнoй трубки у плода. Повышение уровня АФП регистрируется и при других патологических состояниях плода (гастрошизис, омфалоцеле, аномалии почек), а также при угрозе прерывания беременности. В то же время, в 25–30% случаев хромосомных нарушений (болезнь Дауна) уровень АФП с 15-й по 18-ю недели беременности оказывается сниженным (Merkatz I.R. et al., 1984). В настоящее время нет достаточно убедительных объяснений наблюдаемым отклонениям уровня АФП в крови матери при синдроме Дауна у плода. Первоначальная гипотеза о сниженной продукции АФП клетками печени плода с трисомией 21 оказалась несостоятельной. Прямой анализ АФП в печени плодов с СД показал, что его содержание не отличается от нормы. Эти данные говорят в пользу гипотезы о нарушениях транспорта АФП через плаценту у плодов с трисомией 21 (Newby D. et al., 1997). У плодов с СД концентрация АФП снижена и в АЖ. Транс-

порт АФП через плацентарную мембрану является двунаправленным и асимметричным. При этом переход АФП в материнский кровоток преобладает над его обратным транспортом (положительный клиренс АФП) (Brownbill P. et al., 1995). Низкий уровень АФП в АЖ при СД может быть также результатом сниженной функции почек плода, в то время как его продукция клетками печени не меняется (Beekhuis J.R., et al., 1993). Присутствие рецепторов к АФП в тканях ворсинок плаценты подтверждает гипотезу транспорта АФП через плаценту с помощью рецепторного механизма. Отсутствие экспрессии мРНК АФП в плаценте доказывает, что АФП не синтезируется в плаценте, а поступает туда с кровотоком из печени плода (Newby D. et al. 2005). Различия в содержании АФП в пуповинной крови у dizиготных близнецов значительно больше, чем у монозиготных. Это свидетельствует о генетической предопределенности уровня продукции АФП (Norgaard-Pedersen B. et al., 1976). Уровень АФП оказывается сниженным при наличии ВИЧ-инфекции у беременной (Einstein, 2004). Снижение АФП при СД отмечается уже в I триместре беременности, однако дисперсия его распределения в эти сроки на 20% больше, чем во втором, таким образом, кривые распределения уровня АФП в норме и при СД перекрываются сильнее. Ввиду малой чувствительности теста измерение содержания АФП в I триместре с целью скрининга болезни Дауна у плода не проводится (Cuckle H.S., van Lith J.M., 1999; Berry E. et al., 1997). Другие факторы, влияющие на уровень АФП в крови беременной, такие как срок беременности, возраст и вес матери, национальная принадлежность, сопутствующие заболевания (диабет, болезни почек) рассмотрены ниже (см. 7.3).

Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ). В 1927 году появилось первое сообщение о наличии в моче беременных гормона с лютеинизирующей гонадотропной активностью. ХГЧ (молекулярная масса около 36700 Дальтон) синтезируется клетками цитотрофобласта плаценты, вместе с ЛГ, ФСГ и ТТГ принадлежит к семейству гликопротеиновых гормонов, которые продуцируются передней долей гипофиза. Все они являются гетеродимерными белками и состоят из двух неодинаковых нековалентно связанных субъединиц. α -субъединица (14500 Да) кодируется геном, картированным на хромосоме 6. Она является общей для всех четырех гормонов (Birken S., 1984). Последовательность первых 114 аминокис-

лотных остатков β -субъединицы ХГЧ (22200 Да) на 85% гомологична β -субъединице ЛГ, на 46% – ТТГ и на 36% – ФСГ. Высокая гомология между ЛГ и ХГЧ объясняет сходство их биологических функций – они взаимодействуют с одним и тем же клеточным рецептором (Lapthorn A.J. et al., 1994). Вместе с тем, 24 аминокислотных остатка карбоксильного конца β -цепи специфичны только для ХГЧ (Gray C.J., 1988).

ХГЧ – наиболее гликозилированный из всех гликопротеиновых гормонов: углеводы составляют 34% всей массы молекулы ХГЧ. Кластер генов, кодирующих β -субъединицу ХГЧ и ЛГ, расположен в области 13.3 длинного плеча хромосомы 19. В нем содержится семь тандемно расположенных копий гена β -ХГЧ, и один ген β -ЛГ (Boorstein W.R. et al., 1982). Присутствие множества активных генов β -ХГЧ определяет высокий уровень продукции ХГЧ в начале беременности. Свободные β -субъединицы ХГЧ появляются либо вследствие независимой регуляции их синтеза, либо из-за их несостоявшейся ассоциации с α -субъединицами. Существуют данные, подтверждающие обе такие возможности. В пользу первой свидетельствует тот факт, что соотношение числа α - и β -субъединиц ХГЧ изменяется в процессе развития плаценты. Так, в плаценте I триместра беременности уровень мРНК и белка α -субъединицы в два раза выше, чем мРНК и белкового продукта генов β -субъединицы. В конце беременности в плаценте отмечается заметное снижение продукции мРНК обеих единиц, но соотношение между ними возрастает в пользу α -субъединицы в 12 раз (Boothby M. et al., 1983).

Обе субъединицы ХГЧ синтезируются независимо, но в количествах, достаточных для обеспечения образования биологически активного гетеродимера. Однако существуют механизмы, препятствующие образованию димера ХГЧ. Одним из путей нарушения взаимодействия субъединиц является гипергликозилирование α -субъединицы, что препятствует образованию ее комплекса с β -субъединицей (Blithe D.L. et al., 1995).

ХГЧ начинает синтезироваться клетками трофобласта уже на стадии бластоцисты и может быть обнаружен в крови на 5–6-й день после оплодотворения у 60% женщин, а на 10–11-й – у 100% (Димитров Д., 1979). По мере увеличения срока беременности уровень ХГЧ в крови прогрессивно повышается, удваиваясь каждые 1,7–2,2 дня на протяжении

первых 30 дней. Содержание ХГЧ достигает максимума к 8–10-й неделям беременности и составляет примерно 60–500 МЕ/мл. Оно резко падает после 10-й недели в результате дифференциации цитотрофобласта и образования плаценты и остается примерно на одном уровне до родов с небольшим подъемом на 33–35-й неделе. После родов ХГЧ исчезает из крови матери в течение 10–14 дней. Уровень ХГЧ в материнской сыворотке не зависит от времени суток (Canick J.A. et al., 1994).

В связи с наличием различных изоформ, период полураспада ХГЧ в крови колеблется от 8–11 ч (быстрая фаза) до 23–27 ч (медленная фаза). В течение II триместра уровень интактного ХГЧ и свободной β -ХГ падает, а свободной α -ХГ — возрастает.

Важнейшей функцией ХГЧ является стимуляция синтеза стероидных гормонов сначала в желтом теле, а затем в плаценте. Предполагается, что ХГЧ влияет на экспрессию ферментов, участвующих в стероидогенезе, или активирует синтез отдельных неферментативных белковых фракций (Федорова М.В., Калашникова Е.П., 1986). По данным ряда авторов, ХГЧ играет защитную роль, предотвращая отторжение зародыша. Уровень ХГЧ при трисомии хромосомы 21 у плода (синдром Дауна) обычно повышается, а при трисомии хромосомы 18 (синдром Эдвардса) — снижается.

Уровень ХГЧ в крови матери повышен при беременности плодом женского пола, однако причина этого феномена не ясна. В отличие от ХГЧ, содержание эстрадиола, прогестерона, тестостерона, ДГЭАС, пролактина и гормона роста в материнской сыворотке и в пуповинной крови не зависит от пола плода.

Уровень ХГЧ повышен также у беременных, участвовавших в программах вспомогательных репродуктивных технологий, при болезнях почек, при употреблении преимущественно вегетарианской пищи, при наличии ВИЧ-инфекции. При курении во время беременности он понижен.

Наблюдаемое повышение содержания ХГЧ при СД, по всей вероятности, отражает повышенную активность трофобласта и плаценты, направленную на выживание трисомного плода (Kratzer P.G. et al., 1991). Патологические изменения в плаценте при СД могут отражать заметное отставание в созревании ворсинок с частым выявлением признаков их

недоразвития (Oberweis D. et al., 1983). Изучение плаценты при нормальной беременности показало, что цитотрофобласт регулирует продукцию ХГЧ, поддерживая пул транзиторных переходных клеток, максимальное количество которых наблюдается в 8–10 нед. беременности и затем снижается (Hay D.L., 1988).

Существуют различные мнения по поводу эффективности использования интактного (димерного) ХГЧ или его свободной β -субъединицы в качестве маркеров хромосомной патологии плода. Уровни этих маркеров тесно взаимосвязаны между собой, поэтому при проведении интегрального теста достаточно анализировать только один показатель (Knight G.J. et al., 1998). Продукты распада ХГЧ, выделяемые с мочой беременной, тоже могут служить маркерами патологии плода. Показано, что уровень одного из фрагментов ХГЧ – так называемого β -кор ХГЧ, тотального эстриола и их соотношение при синдроме Дауна у плода равны 5,42; 0,64 и 9,32 МоМ соответственно. Чувствительность этого теста при наличии СД у плода с учетом возраста матери составляет 80% при 5% ЛПП (Kellner L.H. et al., 1997).

Неконъюгированный эстриол (НЭ) – плацентарный стероидный гормон, молекулярная масса 288,4 Да. Образуется преимущественно фолликулярными клетками яичников и отчасти гранулезными клетками, выстилающими полость фолликулов. Эстрогены синтезируются также клетками желтого тела и плаценты. Ведущая роль среди эстрогенов во время беременности принадлежит эстриолу. Он синтезируется преимущественно плацентой из стероидных предшественников. Дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГЭАС) образуется в фетальных надпочечниках из холестерина и прегненолона. В печени плода он превращается в 16-ОН-ДЭА-сульфат, который поступает в плаценту и под действием плацентарной сульфатазы гидролизуется. Затем неконъюгированный 16- α -окси-дегидроэпиандростерон превращается в неконъюгированный эстриол. Находящийся в неконъюгированной форме плацентарный эстриол секретируется в материнский кровоток. Период полувыведения НЭ составляет 30 мин.

В крови матери уровень НЭ в норме возрастает с 4 нмоль/л в 15 нед. до 40 нмоль/л к родам (или на 20–25% еженедельно с 15 до 22 нед.) (Wald N.J. et al., 1988b). Уровень НЭ постоянно нарастет с конца I триместра, но за 1–2 нед. до родов его

концентрация быстро падает (Cuckle H.S., Wald N.J., 1992). 90% НЭ в крови беременной имеет фетальное происхождение и находится в свободной форме (Canick D.F. et al., 1999). В ретроспективных исследованиях установлена прямая связь снижения НЭ до 0,5 МоМ с развитием гипертензии, частотой невынашивания, задержкой развития и внутриутробной гибелью плода (Yaron Y. et al., 1999). Можно заподозрить внутриутробную задержку развития плода по низкому уровню НЭ уже во II триместре (Kim S.Y. et al., 2000). Дефицит эстрогенов при анэнцефалии плода, по-видимому, связан с отсутствием стимуляции надпочечников гормонами гипофиза плода (Anderson et al., 1981; Pepe G.J. et al., 1995). Резко сниженное содержание НЭ (0,01 МоМ) вследствие дефицита плацентарной сульфатазы обнаружено при X-сцепленном ихтиозе (Keren D.F. et al., 1995). При нарушении синтеза половых гормонов (например, синдром Смита-Лемли-Опитца) выявляются крайне низкие значения НЭ (Bick D.P. et al., 1999). При синдроме Дауна у плода среднее значение НЭ составляет около 0,79 МоМ и коррелирует с уровнем АФП (Canick D.F. et al., 1988). Активности плацентарной стероидной сульфатазы при СД и в норме не отличаются, в то время как уровень ДГЭАС при СД ниже в плаценте, в сыворотке крови матери и в печени плода (0,54; 0,69 и 0,65 МоМ) (Newby D. et al., 2000). Предполагается, что снижение НЭ в материнской крови связано с недостаточной продукцией плодного ДГЭАС. Необходимо отметить, что при СД так же, как и в норме, существует определенная корреляция уровня НЭ и массы плода.

Трофобластический β -гликопротеин (ТБГ) в зарубежной литературе принято обозначать SP1 (от нем. – Schwangerschaft spezifisches protein 1, синонимы – PAPP-C и P β betaG – pregnancy specific beta-1-glycoprotein). Молекулярная масса 90 000–110 000 Да. Обнаруживается в крови беременных, начиная с 7–10-го дня после овуляции, продуцируется синцитиотрофобластом. Концентрация ТБГ растет с увеличением срока беременности от 13,0 мкг/мл в 5–8 нед. до 300 мкг/мл к 25–28-й неделе беременности. Его уровень достигает «плато» примерно к 36-й неделе и перед родами несколько снижается. Служит хорошим маркером спонтанных аборттов на ранних сроках беременности. Отсутствие положительной динамики или снижение концентрации ТБГ свидетельствуют

о большой вероятности задержки развития плода или самопроизвольного выкидыша. При синдроме Дауна у плода снижается уровень ТБГ в I триместре и повышается относительно нормы – во II, хотя и не очень значительно (до 1,28 МоМ) (Bartels I. et al., 1988). Средний уровень ТБГ с 10-й по 14-ю неделю в 96 образцах крови беременных с СД у плода составил 0,86 МоМ. Разница статистически значимая, но недостаточная для использования ТБГ в I триместре (Wald N.J. et al., 1999b). В некоторых странах (Чехия) ТБГ применяется как один из маркеров состояния плода во II триместре.

Ингибин А. Ингибин (или активин) выделен из фолликулярной жидкости в 1985/86 гг. Ингибин – гликопротеин с молекулярной массой около 32 кДа – димер, состоит из двух субъединиц: α и β . β -субъединица существует в двух вариантах – А и В, соответственно и ингибин называется А или В. Активином называют гомодимерный комплекс из двух β -субъединиц с молекулярной массой 24 кДа (таким образом, существует активин А, В или АВ) (Robertson D.M. et al., 1985; Ying S.Y. et al., 1988). Структурно похожие белки, однако, играют различную роль в регуляции высвобождения ФСГ – ингибин селективно подавляет секрецию ФСГ гипофизом, в то время как активин стимулирует продукцию ФСГ. У женщин эти белки участвуют в регуляции синтеза гормонов, регулирующих созревание ооцитов и развитие эмбриона (Hillier S.G. et al., 1991). Ингибин продуцируется не только гонадами, но также гипофизом, надпочечниками и плацентой (Cartoll R.S. et al., 1991).

α -субъединица ингибина синтезируется как пре-про-альфа. Наличие многочисленных предшественников осложняет детекцию ингибина иммуноферментным методом.

Ингибин появляется в крови беременной на девятый день после выхода ооцита, его появление совпадает с повышением уровня ХГЧ. Предполагается, что на самых ранних стадиях беременности ингибин синтезируется клетками желтого тела. Затем он начинает секретироваться клетками других органов. Повышение секреции ингибина экстрагонадными тканями может быть главной причиной супрессии выработки ФСГ гипофизом в период беременности. Концентрация ингибина в 5 нед. беременности выше, чем у небеременных женщин с нормальным менструальным циклом. Она повышается до максимума к 8–10-й неделе, затем падает с 14-й до 20-й недели, после чего снова медленно повышается вплоть до 40-й не-

дели. Динамика содержания ингибина позволяет предполагать, что первый пик отражает функцию желтого тела, а его дальнейшее нарастание — функцию быстро растущей плаценты. После родов ингибин исчезает из сыворотки матери в течение первых суток (Qu J., Thomas K., 1993, 1995).

Период полужизни ингибина составляет 0,63–0,76 ч. Многие факты свидетельствуют о том, что плацента, скорее всего, является главным источником ингибина при беременности.

Ингибин может продуцироваться как цитотрофобластом, так и синцитиотрофобластом *in vivo* (Qu J., Thomas K., 1995). В плаценте выявлена экспрессия мРНК как α -субъединицы, так и обеих β -субъединиц. Исходя из уровня экспрессии, можно заключить, что плацента продуцирует ингибин В и активин В и АВ на поздних стадиях беременности (Petraglia F. et al., 1991). Ряд наблюдений доказывает, что ингибин и активин могут играть важную роль в регуляции секреции ХГЧ плацентой в течение беременности (Qu J., Thomas K., 1993).

Уровень α -фетопротеина, свободной β -субъединицы ХГЧ, интактного ХГЧ и димерного ингибина А были исследованы в образцах сыворотки крови, полученной на 7–18-й неделях от 58 беременных плодом с синдромом Дауна, 32 — с синдромом Эдвардса и 438 — с нормальным плодом. При СД у плода концентрация ингА оказалась в 2,06 раза выше, чем медиана (средняя величина) при нормальной беременности. Эта величина совпадала с двукратным увеличением свободной β -ХГЧ, с увеличением в 1,82 раза интактного (димерного) ХГЧ и уменьшением до 0,72 α -фетопротеина. В случае СЭ у плода эти различия были не столь значительны. Чувствительность по выявлению СД у плода составила 53% для АФП и свободной β -ХГЧ. При добавлении ингА чувствительность теста увеличивается до 75%. Одним из преимуществ включения ингА является его достаточно стабильный уровень во II триместре. Поэтому ошибка в определении гестационного срока практически не влияет на точность расчета риска (Aitken D.A. et al., 1996).

Белок S100. Протеин S100 — низкомолекулярный кальций-связывающий белок, концентрация которого в крови плода с синдромом Дауна резко возрастает. Учитывая, что ген, кодирующий этот белок, расположен на длинном плече 21-й

хромосомы, в 1990-е годы ожидали, что в крови матери его уровень будет также увеличен. Однако достоверной разницы уровня S100 в крови беременных при нормальном кариотипе у плода и при трисомии 21 не обнаружено. Высказано предположение, что этот белок не проходит плацентарный барьер, поэтому не может использоваться в качестве маркера СД при биохимическом скрининге.

Все рассмотренные биохимические маркеры являются эмбрионспецифичными, т.е. продуцируются клетками самого плода или плаценты и поступают в кровоток матери. Вне беременности они не встречаются или обнаруживаются в минимальных количествах. Концентрация этих маркеров в сыворотке крови женщины меняется в зависимости от срока беременности и от состояния плода, что, собственно, и позволяет использовать их для БС хромосомных болезней и некоторых пороков развития плода.

7.3. АЛГОРИТМЫ БС И ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЕГО РЕЗУЛЬТАТЫ

В 1987 г. появились первые рекомендации по практическому проведению БС. При этом отмечались следующие положения:

1. Потенциальные возможности скрининговых тестов изучены недостаточно. Необходимо обучение персонала для проведения работы с пациентами.

2. Информация о скрининге должна обсуждаться с беременными как можно раньше, чтобы к моменту проведения тестирования женщина могла вполне осознанно принять решение, и положительный результат БС (повышенный риск патологии у плода) не пугал ее.

3. Тестирование должно осуществляться в компетентной лаборатории, участвующей в системе внешнего контроля качества и постоянно имеющей большой поток пациенток.

4. БС должен завершаться расчетом риска рождения ребенка с СД.

Прежде чем начинать массовые исследования сыворотки крови, необходимо продумать все организационные вопросы, возникающие при получении женщиной положительных результатов. Самое главное — возможность быстрого проведения инвазивной ПД. В группе высокого риска ощущение беспоконья может мешать четкой организации дальнейшего

обследования беременной. Схема обследования должна выглядеть таким образом, чтобы время от консультации генетика до инвазивной ПД было минимальным (рис. 7.1).

До начала БС лаборатории необходимо получить для используемых тест-систем нормальные распределения содержания маркерных белков по каждой неделе беременности. Достаточно устойчивые цифры медиан, на которые уже можно ориентироваться в расчетах, требуют исследования, по крайней мере, 30–50 образцов крови на каждую неделю беременности. В таблице 7.1 приведены медианы содержания АФП и ХГЧ с 15-й по 20-ю неделю беременности, полученные на наборах тест-систем фирмы «Алкор Био» (Санкт-Петербург) в ГУ НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН.

Общепринятым обозначением отклонений уровня МСБ является отношение величины содержания МСБ в крови конкретной женщины к средней величине содержания определяемого белка у женщин этого срока при нормальной беременности (медиане). Кратность медиане выражается в единицах МоМ (multiples of median). Например, уровень АФП=2,5 МоМ означает, что содержание белка в сыворотке

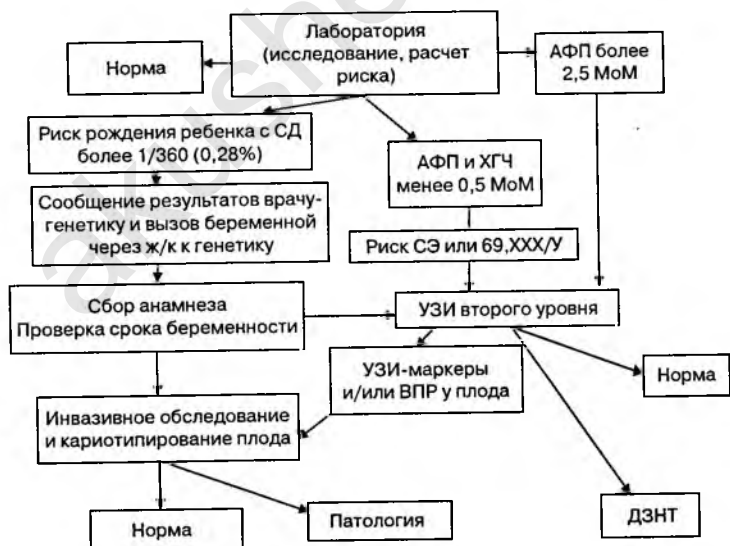


Рис. 7.1. Схема обследования беременных с положительными результатами биохимического скрининга во II триместре.

Таблица 7.1

**Медианы содержания АФП и ХГЧ
в сыворотке крови на разных сроках беременности
(«Алкор Био», Санкт-Петербург)**

| Срок беременности, нед. | АФП, нг/мл | ХГЧ, ед/мл |
|-------------------------|------------|------------|
| 14 | 33 | 55 |
| 15 | 37 | 48 |
| 16 | 42 | 41 |
| 17 | 48 | 35 |
| 18 | 53 | 31 |
| 19 | 55 | 29 |
| 20 | 57 | 29 |

крови у данной беременной в 2,5 раза выше, чем медиана (норма) для этого срока беременности.

Таким образом, после получения нормальных распределений содержание маркеров выражают в единицах МоМ (т.е. в кратности медиане). В литературе долго обсуждалось, насколько корректно к нормальному распределению уровня маркера применять статистические методы, относящиеся к гауссову распределению. Наши данные показывают, что содержание АФП и ХГЧ в 52 000 образцов крови беременных Санкт-Петербурга за 2002–2003 гг. соответствует этому закону распределения. Нормальными значениями в диагностические сроки считаются уровни белков от 0,5 до 2 МоМ. Не следует забывать, что при расчете риска в программе гибко учитывается сдвиг маркеров от нормы, а не используются границы допустимых значений 0,5 и 2 МоМ.

Схема обследования для выявления беременных групп высокого риска рождения детей с ДЗНТ или хромосомными болезнями приведена на рисунке 7.2.

Биохимический скрининг для выявления групп риска ДЗНТ и синдрома Дауна у плода наиболее эффективен при сроках беременности 15–18 нед. Скрининг проводится путем тестирования сразу трех маркерных белков АФП, ХГ и НЭ («тройной тест») или только двух из них – АФП и ХГЧ. Чувствительность биохимического скрининга при исследовании трех белков по сравнению с определением двух маркерных белков повышается на 4–5%. В настоящее время существует quadro-тест (АФП,

ХГЧ, НЭ и инГА), при котором одновременно формируется группа риска хромосомных болезней у плода и беременных с риском преэклампсии. Добавление инГА к тройному тесту приводит к повышению чувствительности и снижению ЛПР (по разным данным – с 5–6 до 3–4%). Ввиду противоречивости данных необходимо проведение собственных исследований для принятия решения о практической значимости такого теста. Однако тест-системы для определения ингибина А в России не производятся, а зарубежные достаточно дороги.

Для биохимического скрининга беременных во II триместре в Санкт-Петербурге используют так называемый «двойной» тест – АФП и ХГЧ.

Если за основу отбора беременных в группу высокого риска принять значения АФП ниже 0,5 МоМ и ХГЧ выше 2,0 МоМ, как иногда делают при отсутствии соответствующих программ, то количество ложноположительных результатов (ЛПР) будет около 30% от числа обследованных. При этом в группу риска не попадут

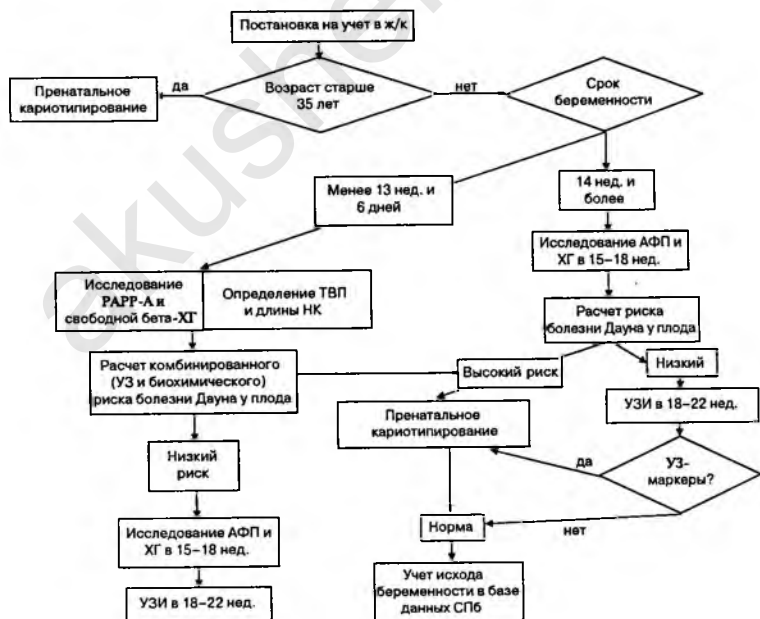


Рис. 7.2. Схема обследования беременных в I и II триместрах.

те случаи СД, когда АФП находится в диапазоне 0,5–0,7 МоМ. Между тем, как показывает наш опыт, средний уровень АФП при СД равен 0,78 МоМ (N=168) (Кашеева Т.К. и др., 2004). Увеличение границы АФП до 0,8 МоМ приведет к дальнейшему росту числа ЛПР. Для оценки риска трисомии 18 и триплоидии (уровень АФП и ХГЧ ниже 0,5 МоМ или только ХГЧ ниже 0,5 МоМ) можно использовать пороговые значения этих маркеров, поскольку численность этой группы риска не превышает 1% от всех обследованных. Вместе с тем, во избежание лишних инвазивных процедур, необходимо стремиться к снижению числа ЛПР. Поэтому в настоящее время наиболее эффективным является расчет вероятности рождения ребенка с СД с учетом возрастного риска женщины, модифицированного с помощью отношения правдоподобия (likelihood ratio) или отношения шансов. Оно определяется как отношение вероятности, что беременная входит в группу нормальных значений к вероятности, что ее результаты относятся к распределению маркеров для беременных с СД у плода (Cuckle H.S. et al., 1987) (рис. 7.3).

Риск рождения ребенка с СД вычисляется как произведение возрастного риска женщины на отношение правдоподобия. Опубликована приближенная формула, которая описывает эмпирическую кривую зависимости вероятности рождения ребенка с СД от возраста матери. Она получена на основе большого статистического материала (более 500 случаев СД) (Cuckle H.S. et al., 1987).

$$\text{Возрастной риск} = \frac{1 - 0,000627 + \exp(-16,2395 + 0,286 \times \text{возраст матери})}{0,000627 + \exp(-16,2395 + 0,286 \times \text{возраст матери})}$$

Основным фактором, изменяющим индивидуальный риск, является неточное определение срока беременности. Динамика содержания АФП и ХГЧ в зависимости от срока беременности в период с 15 до 20 нед. приведена в таблице 7.1. Легко заметить, что уровни маркеров весьма значительно отклоняются при изменении срока беременности (Aitken D.A. et al., 1994), что отражается на расчете риска. Если срок беременности устанавливается по УЗИ, необходимо использовать для оценки срока гестации копчико-теменной размер (КТР), который при трисомии 21 у плода не отличается от нормального (Wald N.J. et al., 1992b). Если к моменту забора крови для биохимического скрининга УЗИ не проводилось, необходимо ориентироваться на менструальный

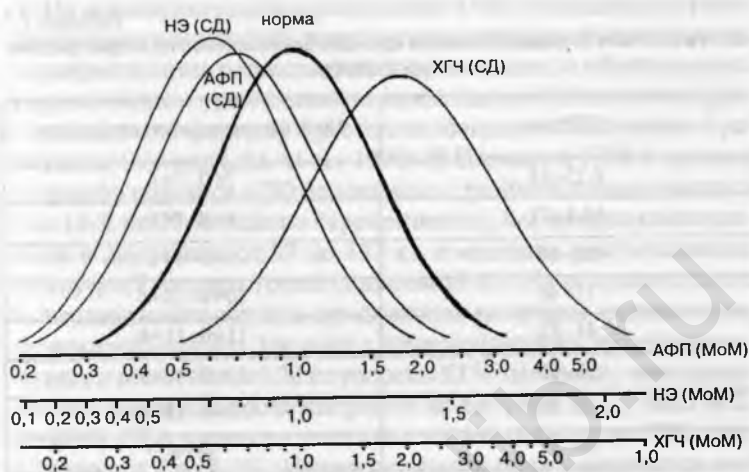


Рис. 7.3. Распределение уровней АФП, ХГЧ и НЭ в сыворотке крови беременных нормальным плодом и плодом с синдромом Дауна (СД).

срок. Расхождение между УЗИ и менструальным сроком — обычное явление. Разные подходы позволяют преодолеть эти различия. Во-первых, срок беременности, установленный по УЗИ, точнее, чем менструальный. Поэтому срок, определенный по УЗИ, предпочтителен, если расхождение составляет семь и более дней. Следует учитывать, что расхождения в определении сроков беременности возможны и при использовании УЗИ. В УЗ аппарате обычно уже заложены таблицы определения сроков беременности. При этом разные авторы указывают разные диапазоны размеров плода для одного срока. Различия особенно значительны на краях диапазонов, где одному и тому же БПР или КТР соответствует разный срок беременности (со сдвигом на 3–5 дней) (см. табл. 7.2). Есть биометрические таблицы, построенные для групп беременных разного срока, на основании которых судят о размерах плода. В таблицах обоих типов возможно большое расхождение. Наконец, в биометрических измерениях существует систематическое смещение, зависящее от оператора и оборудования. *Поэтому для повышения эффективности биохимического скрининга необходимы согласованные действия всех кабинетов УЗИ на той территории, где осуществляется БС.*

Таблица 7.2

Соответствие размеров плода срокам беременности в программе
Лайф Сайкл

| КТР, мм | Срок беременности, нед. + дни |
|---------|-------------------------------|
| 8,15–14 | 7+0–7+6 |
| 14,1–21 | 8+0–8+6 |
| 22–30 | 9+0–9+6 |
| 31–40 | 10+0–10+6 |
| 41–52 | 11+0–11+6 |
| 53–65 | 12+0–12+6 |
| 66–79 | 13+0–13+6 |
| 80–83 | 14+0 |

Как завышение, так и занижение срока беременности приводит к уменьшению не только числа ЛПР, но и выявляемости, так как при истинноположительных результатах беременная переходит в группу с отрицательными результатами скрининга и получает ложную уверенность в нормальном состоянии плода. Эта ситуация проиллюстрирована в нескольких сериях обширных исследований (Haddow J.E. et al., 1992; Wald N.J. et al., 1992b).

Как уже отмечалось, при беременности плодом женского пола наблюдается снижение АФП или повышение ХГЧ. В любом случае, это приводит к большему количеству ЛПР при женском поле плода.

При расчете индивидуального риска кроме возраста необходимо учитывать влияние и других факторов, изменяющих уровни маркерных белков. В первую очередь, учитывается количество плодов, вес беременной, курение, раса и наличие у матери инсулинозависимого сахарного диабета (ИЗСД) (Дубинина И.Г., 1990).

- Поправки на вес беременной приводят к очень небольшому улучшению результатов скрининга (детекция увеличивается не более, чем на 1%), потому что изменение величин всех маркеров в МоМ в соответствии с весом приводит к разнонаправленному воздействию на конечный риск. Например, повышение ХГЧ повышает риск, в то время как повышение АФП и НЭ уравнивает этот риск и даже снижает его.

На основании анализа результатов 47585 обследований рекомендуется описывать зависимость маркеров от веса не логарифмическим регрессионным уравнением, а обратным регрессионным уравнением, и применять собственную корреляционную формулу с учетом особенностей населения в регионе (Neveux L.M. et al., 1996). В Израиле в 1998 г. провели анализ образцов 6700 беременных (тройной тест проводился с 16-й по 20-ю неделю беременности), вес женщин находился в диапазоне от 37 до 137 кг, а медианы рассчитывались внутри 7 весовых групп (с шагом 10 кг). На основании этого исследования авторы предложили поправки отдельно для каждого маркера. Не нашел объяснения факт, что у беременных с весом более 120 кг уровень ХГЧ был выше, чем ожидалось после введения поправки на вес (Watt H.C., Wald N.J., 1998). При введении поправки на вес количество ЛПР снизилось с 7 до 6,5%. Индивидуальный риск в отдельных случаях изменился вдвое (Spencer K. et al., 2003a). В нашем алгоритме (Кашеева Т.К. и др., 2002) мы воспользовались поправками, приведенными в работе 1992 г. (Wald N.J. et al., 1992b). По нашему мнению, вес беременной оказывает незначительное влияние на эффективность скрининга, но для пограничных значений риска у отдельных беременных может сыграть важную роль при решении вопроса о проведении инвазивных вмешательств. Окончательное заключение о корректном применении поправок на вес для беременных Санкт-Петербурга требует дополнительного анализа.

- Влияние курения беременной на состояние фетоплацентарного комплекса отмечается во многих работах (Palomaki G.E. et al., 1993; Crossley J.A. et al., 2002). Курение во время беременности приводит к снижению уровня ХГЧ (по разным данным от 10 до 20% от нормы), что снижает эффективность скрининга на СД среди молодых беременных. С возрастом число курильщиц снижается – от 35% курящих до 20 лет до 7% среди женщин старше 35 лет, в среднем курит 11,5% беременных (Spencer K. et al., 2004). Этот факт необходимо иметь в виду при консультировании по результатам скрининга, так как невозможно ввести коэффициенты для количественного учета влияния данного фактора на расчет риска.
- Ставится под сомнение необходимость учитывать наличие инсулинозависимого сахарного диабета (ИЗСД) при проведении БС в связи с тем, что в условиях постоянного контроля за уров-

нем сахара в крови состояние таких беременных не отличается от нормального. Незначительные отклонения в уровне глюкозы не приводят к патологическим изменениям в организме (Peled Y., 2003). Другие авторы проанализировали 366 случаев и показали, что беременные с ИЗСД имеют сниженный уровень АФП. Медиана АФП у них в крови при нормальном кариотипе плода равна 0,88 МоМ. В Лидсе изучили 127 случаев беременностей с ИЗСД – уровень АФП во II триместре был снижен до 0,72 МоМ (для 40 из них АФП определялся в I триместре и медиана равна 0,93 МоМ) (Huttly W. et al., 2004).

- Число плодов оказывает значительное влияние на показатели МСБ. При двойне АФП, НЭ, ХГЧ, свободная α - и β -субъединицы ХГЧ имеют повышенный уровень с медианами 2,13; 1,67; 1,84; 1,66 и 1,90 МоМ соответственно (Wald N.J. et al., 1992a). Рекомендуется рассчитывать для двоен «псевдориск», потому что нет результатов обследования достаточного количества двоен с СД для построения распределения уровня маркеров в случае СД у двойни. Вопрос о МСБ при многоплодных беременностях, наступивших после применения вспомогательных репродуктивных технологий, рассматривается отдельно (см. раздел 7.9).
- У беременных, участвовавших в обследовании по программе клиники одного дня, наблюдается повторный повышенный риск, если при предыдущей беременности она попала в группу риска по комбинированному УЗ и биохимическому скринингу в I триместре (Spencer K., 2002b).
- Необходимо вносить поправки в алгоритм расчетов риска для беременных с трисомиями 21, 13 или 18 у ребенка или плода в анамнезе. При анализе 375 случаев повторной беременности плодом с трисомией (303 – трисомия 21, 63 – трисомия 18 и 9 – трисомия 13) установлено, что средний уровень свободной β -субъединицы в крови таких беременных повышен на 10%, а РАРР-А – на 15%. Для других маркеров таких отклонений не было выявлено (Cuckle H. et al, 2005). Если в анамнезе у пациентки отмечается наличие ребенка или плода с трисомией 21, то риск увеличивается на 0,77% в I триместре, на 0,52% – во II и на 0,42% – на момент рождения (Cuckle H., Arbuzova S., 2004).

7.4. ОПТИМАЛЬНЫЙ СРОК БС

Скрининг МСБ обычно проводят на 15–18-й неделях беременности. Скрининг уровня АФП недостаточно информа-

тивен в более ранние сроки, так как в I триместре АФП не имеет диагностической ценности для выявления ДЗНТ. В литературе встречаются работы, в которых срок проведения скрининга для профилактики хромосомных нарушений расширяется до 22 нед. беременности (Muller F. et al., 2002). Наш опыт говорит о том, что сужение срока проведения биохимических исследований помогает решить несколько проблем:

1) Чем более однотипно (стандартно) проводится исследование, тем меньше величина дисперсии распределения. Это уменьшает перекрытие распределений в норме и при патологии, тем самым уменьшается число ложноположительных результатов. В идеале необходимо все исследования проводить в один срок – 15/16 нед. беременности. Это мнение поддерживают и авторы исследования, в котором 16 из 20 (80%) беременных с СД у плода, обследованных до 17 нед., имели риск более чем 1:300, в то время как после 17 нед. в группу риска попало только 4 из 12 (33%) (Goldie D.J. et al., 1995);

2) Чем позже регистрируется положительный результат скрининга, тем позже может быть проведена инвазивная ПД (т.е. возрастает доля кордоцентезов по сравнению с плацентоцентезом, что рассматривается как отрицательный показатель организации ПД);

3) В более поздние сроки уменьшается точность анализа, так как нарастают отклонения в уровнях маркеров, связанные с акушерскими осложнениями. Риск при повторном исследовании в более поздние сроки может уменьшиться, как отмечалось нами в 5 наблюдениях при синдроме Дауна у плода (Кашеева Т.К. и др., 2004).

7.5. О ПОВТОРНОМ ИССЛЕДОВАНИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ

Повторное исследование одних и тех же маркерных белков в целях подтверждения положительного результата БС, полученного в оптимальные для скрининга сроки, не рекомендуется. Как уже упоминалось, оптимальным сроком исследования является срок 16 нед. Мы наблюдали 5 случаев рождения детей с синдромом Дауна после того, как уменьшение риска при повторном определении АФП и ХГЧ в 18–20 нед. подталкивало женщину к отказу от кариотипирования плода (см. табл. 7.3). Повторное исследование может нести полезную информацию для акушера-гинеколога о динамике показателей при проведении терапии

Таблица 7.3

Снижение риска рождения больного ребенка в 5 случаях повторных исследований АФП и ХГ в более поздние сроки (при БД у плода) (собственные данные)

| Номер образца | Риск патологии, % | |
|---------------|-------------------|------------|
| | 15/16 нед. | 18/19 нед. |
| 1 | 1,35 | 0,4 |
| 2 | 1,9 | 0,9 |
| 3 | 1,75 | 0,61 |
| 4 | 0,76 | 0,13 |
| 5 | 1,3 | 0,03 |

фетоплацентарной недостаточности (после исключения хромосомных аномалий у плода при пренатальном кариотипировании) и к генетическому скринингу отношения не имеет.

7.6. ПОРОГОВОЕ ЗНАЧЕНИЕ РИСКА СИНДРОМА ДАУНА

Риск рождения ребенка с синдромом Дауна, согласно которому происходит отбор в группу высокого риска, называется пороговым. Эта величина обычно устанавливается органами здравоохранения региона, где проводится БС. В разных странах она варьирует от 1/360 до 1/190 (т.е. от 0,28 до 0,52%). В Санкт-Петербурге пороговым значением риска считается величина 1:360 (0,28%), соответствующая риску рождения ребенка с СД у женщины, которая забеременела ровно в 35 лет и должна родить в 35 лет и 9 мес. Такое значение повышает количество ложноположительных результатов до 6,7% при повышении чувствительности скрининга до 71,4%. Ниже приведена таблица соответствия порогового риска и чувствительности биохимического скрининга, т.е. выявляемости

Таблица 7.4

Выявляемость больных СД в зависимости от выбранного порогового риска (N=134) (собственные данные)

| Пороговый риск рождения ребенка с СД | Выявляемость, % |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1/360 (0,28 %) | 74,3 |
| 1/250 (0,40 %) | 68,2 |
| 1/200 (0,50%) | 60,1 |

плодов с СД, на примере 134 случаев СД у плода во II триместре (данные по Санкт-Петербургу) (табл. 7.4).

7.7. УРОВЕНЬ МСБ ПРИ ХРОМОСОМНОЙ ПАТОЛОГИИ ПЛОДА

Согласно нашим данным, средний уровень АФП при трисомии 21 (синдром Дауна), подтвержденной кариотипированием плода, составляет 0,7 МоМ, ХГЧ – 2,3 МоМ (N=168). Ретроспективный анализ исследований, включающих 157 000 сывороток крови от беременных плодом с нормальным кариотипом и от 706 до 1086 образцов при СД у плода, показал, что АФП в 16 нед. беременности при СД равен 0,72 МоМ; свободная субъединица ХГ равна 2,24 МоМ; тотальный ХГ равен 1,93 МоМ (Spencer K. et al., 2003b).

Особый интерес представляют изменения МСБ при других хромосомных болезнях.

Так, в наших исследованиях при пренатальном кариотипировании было выявлено 17 случаев трисомии 18 (синдром Эдвардса). При этом средний уровень АФП составил 1,05 МоМ, ХГЧ – 0,39 МоМ и НЭ = 0,7 МоМ. Французские исследователи предлагают двухэтапный БС для выявления беременных с риском трисомии 18 у плода. На первом этапе измеряется уровень АФП и ХГЧ, а затем в образцах крови с показателями АФП и ХГЧ менее 0,5 МоМ (82% случаев при 10% ЛПР) определяется уровень РАРР-А. Содержание РАРР-А оказалось менее 0,5 МоМ в 100% случаев трисомии 18 при 0,1–0,2% ЛПР (Muller F. et al., 2002).

Для триплоидии (69, ХХХ, 69, ХХУ) у плода по нашим данным (7 случаев) характерны крайне низкие (0,02–0,05 МоМ) уровни ХГЧ. Описаны случаи и экстремально высоких уровней ХГЧ в сыворотке крови матери при триплоидии у плода (Hanning I., Mires G.J., 2002), но в нашей практике они пока не встретились. При очень высоких показателях ХГЧ беременная оказывается в группе риска по СД, и подобная патология должна быть выявлена.

При трисомии 13 (синдром Патау) у плода средний уровень АФП, ХГЧ и НЭ составил 1,35, 0,71 и 0,90 МоМ соответственно (Saller et al., 1999). Таким образом, биохимический скрининг во II триместре не выявляет группу высокого риска по рождению детей с синдромом Патау.

Следует отметить, что в отличие от трисомии 21, для других хромосомных патологий (трисомии 13 и 18, триплоидия, моно-

сомия X) характерны не столько изменения показателей МСБ, сколько анатомические пороки развития. Поэтому женщины с высоким риском по рождению ребенка с другой хромосомной патологией чаще попадают на ПД по результатам УЗ скрининга.

7.8. ЗАВИСИМОСТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БС ОТ ВОЗРАСТА

В таблице 7.5 приведены средние риски для беременных разных возрастных групп (Вахарловский В.Г. и др., 2004). Поскольку в формулу расчета входит возрастной риск беременной, то очевидно, что при одних и тех же отклонениях МСБ (например, при уровне АФП, равном 0,5 МоМ, а ХГЧ – 2,5 МоМ) у беременной 20 лет риск будет 0,3%, а в 43 года – 12,5%! Из рассматриваемых групп наиболее уязвимой в отношении выявления беременных с риском рождения ребенка с болезнью Дауна являются женщины в возрасте 18–24 года, так как их возрастной риск естественно мал и далеко не всегда компенсируется повышением доли «биохимического» риска в комплексном расчете. Чувствительность биохимического скрининга в этой группе при пороговом значении 0,28% составляет всего 35,7%. Крайне важно беременную младшей возрастной группы с пограничными показателями риска и классическими для СД отклонениями МСБ направить на УЗИ 2-го уровня. Зачастую наличие УЗ-маркера помогает разрешить сомнения пациентки с пограничным «биохимическим» риском в пользу проведения пренатального кариотипирования. Одна-

Таблица 7.5

Риск болезни Дауна у плода, рассчитанный по результатам биохимического скрининга II триместра, в разных возрастных группах у матерей детей с болезнью Дауна

| Возраст беременной, лет | Число обследованных | Средний риск болезни Дауна, % | Чувствительность скрининга, % |
|-------------------------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 18–24 | 28 | 0,289 | 35,7 |
| 25–29 | 26 | 0,483 | 57,6 |
| 30–34 | 21 | 0,990 | 66,7 |
| 35–38 | 24 | 1,752 | 91,6 |
| 39–41 | 25 | 4,794 | 98,0 |
| 42–45 | 17 | 9,190 | 100 |

ко следует напомнить, что УЗ-маркеры выявляются только у 40% плодов с СД (Снайдерс Р.Дж.М., Николаидес К.Х., 1997).

В отличие от молодых беременных, БС оказывается более эффективным в группе беременных 35–45 лет. По данным ретроспективного анализа, «биохимический» риск рождения ребенка с СД составлял в этой группе 6,99% при чувствительности скрининга 98% (см. табл. 7.5).

7.9. БИОХИМИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ И МНОГОПЛОДНАЯ БЕРЕМЕННОСТЬ

Одной из наиболее частых причин повышения АФП, либо обоих МСБ (АФП и ХГЧ) является многоплодная беременность. В 1995 г. в исследовании из 35 150 беременностей было 410 двоен (Neveux L.M., 1996). Известно, что наличие двойни положительно коррелирует с возрастом матери. Из 274 двоен, определенных до скрининга, 15,5% имели повышенный уровень МСБ. При учете поправок на возраст матери и способ определения срока беременности, число ЛПР между двойнями и одноплодными беременностями сравнивалось. 9 из 14 (64%) беременных высокого риска с двойней прошли инвазивную ПД. Патологии кариотипа у них выявлено не было. Теоретически, исходя из модельных построений, при 5% ЛПР при БС может быть обнаружено 73% монозиготных и 43% дизиготных двоен с СД, т.е. их выявляемость в среднем должна составить 53% (Neveux L.M., 1996).

Предлагаются различные подходы к оценке риска в случае двух плодов. Для монохориальной двойни ТВП усредняется для двух плодов до расчета риска и до включения биохимических маркеров в расчет. Для дихориальных (дизиготных) плодов делается расчет риска для каждого плода и только после этого подсчитывается комбинированный риск. Таким образом, мы пытаемся получить «псевдориск» для беременной, а не для каждого плода. Название «псевдориск» отражает недостаточное количество данных для двоен с СД, что необходимо для подсчета истинного риска. При подсчете риска учитывают результаты скрининга ТВП, комбинированного (ТВП + БС в I триместре) и интегрального скринингов (ТВП + БС в I триместре + БС во II триместре). Результаты скрининга интерпретируются с учетом возраста беременных (Wald N.J. et al., 2003).

По нашим наблюдениям (1997–2004 гг.), в Санкт-Петербурге не было случаев рождения сразу двух плодов с СД из двойни. Средний уровень АФП при беременности двойней в норме

составил 2,53 МоМ, а ХГЧ – 2,14 МоМ (N=72). Для расчета риска наличия плода с синдромом Дауна применяется следующий метод – показатели уровня маркеров делятся на число плодов (2) и рассчитывается «псевдориск» для одного плода. За 8 лет наблюдений в Санкт-Петербурге было зарегистрировано только два случая рождения ребенка с синдромом Дауна из двойни. Второй ребенок в обоих случаях был здоровым. У одной беременной (возраст 31 год) в 6 нед. были обнаружены следующие показатели МСБ: АФП=1,6 МоМ, ХГЧ=3,5 МоМ, риск=0,229%. Во втором случае у пациентки 40 лет риск рождения ребенка с СД равнялся 1,47% (АФП = 1,66 МоМ, ХГЧ=2,14 МоМ). От кордоцентеза ввиду выраженной угрозы на консилиуме решено было воздержаться.

7.10. БС И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ РЕПРОДУКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Особое место в БС занимают пациентки, беременность у которых наступила после применения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), чаще всего после ЭКО. Такая беременность протекает на измененном гормональном фоне. Группа высокого риска синдрома Дауна у плода среди таких женщин достаточно многочисленна. Число ложноположительных результатов в этой группе по некоторым данным составляет около 30% вместо 5% в общей массе беременных (Frishman G.N. et al., 1997; Kascheeva T. et al., 2001). Данные литературы по БС в группе беременных после применения ВРТ достаточно противоречивы. По результатам исследований в 1996–1999 гг. рядом авторов было установлено, что содержание ХГЧ в сыворотке крови при беременности после оплодотворения *in vitro* повышен, в то время как содержание АФП и НЭ снижается, тем самым увеличивается число ЛПР среди беременных в результате ЭКО (Barkai G. et al., 1996; Heinonen S. et al., 1996; Lam Y.H. et al., 1999). По другим данным уровень ХГЧ при использовании ВРТ достоверно выше (1,12 МоМ по сравнению с 0,99 МоМ), но это не вносит существенного вклада в увеличение группы риска. Число ЛПР при ВРТ и в контроле составило 5,5 и 4,6%, т.е. повышение составляет не более 0,9% (Ghizoni L., 2003). В группе из 104 беременных одним плодом, 81 – двумя и 33 – тремя плодами сравнивали результаты УЗ и БС с истинным сроком беременности (по дате переноса эмбриона) и пришли к заключению,

что в I триместре сроки беременности были завышены на 1,3; 1,4 и 0,8 дней для каждой из этих групп. Наоборот, во II триместре отмечено занижение сроков на 0,1; 0,6 и 0,6 дня (Kalish et al., 2004). В другом исследовании завышение срока, в среднем, составило 3 дня в I триместре и 0,8 дня — во II (Saltvedt S. et al., 2004). Разночтения в сроках обусловлены тем, что до сих пор остаются дискуссионными вопросы определения истинного срока беременности и темпов развития эмбриона, полученного в условиях *in vitro*, после его переноса в матку.

При проведении ЭКО достаточно часто применяется подсадка нескольких эмбрионов, что в случае хорошей выживаемости приводит к необходимости редукции третьего/четвертого плода. Анализ содержания МСБ в I триместре беременности до и после редукции показал, что уровень PAPP-A в 3 группах пациенток (12 одноплодных беременностей, 12 двоен и 12 — после редукции) после редукции остается значительно выше, чем для двойни, в то время как концентрация ТБГ снижается до нормы для двойни к 19-й неделе. Это позволило предположить, что ТБГ отражает массу плаценты для оставшихся живых плодов, а PAPP-A продуцируется как плацентой, так и децидуальной и другими тканями (Abbas N.J. et al., 1996). Содержание АФП в 16 нед. у 88,5% (24 из 27) пациенток после редукции одного плода из двух оставалось более 2 МоМ (в среднем — 4,6), хотя ВПР отсутствовали (Rotmensch S. et al., 1999).

При биохимическом скрининге и расчете риска для беременных, которые используют донорские яйцеклетки, естественно, должен учитываться «возраст» яйцеклетки, а не вынашивающей женщины (Donnenfeld A.E. et al., 2002). При генетическом консультировании по скринингу в СПб такой подход применяется с момента появления первых беременных после ЭКО (1993—95 гг.). За время наших наблюдений в скрининге участвовало всего 5—6 беременных старше 40 лет с донорскими яйцеклетками от молодых женщин. Уровень АФП и НЭ у беременных при использовании донорских яйцеклеток значительно выше, чем при ЭКО собственных яйцеклеток (Barkai G. et al., 1996).

В I триместре в циклах после ЭКО уровень PAPP-A до 10-й недели был снижен, ТБГ — имел тенденцию к снижению, ХГЧ — был повышен, и это повышение сохранилось после 10-й недели. Число ЛПР также оказалось повышенным. В настоящее время для такой эксклюзивной группы женщин нет возможности установить специальные медианы, слиш-

ком разнообразен подход и методы стимуляции при ВРТ (Bersinger N.A. et al., 2004).

Наши результаты свидетельствуют о снижении уровня АФП (до 0,7 МоМ) в крови беременных после ЭКО и повышении уровня ХГЧ примерно в 1,5–1,7 раза (Kascheeva T. et al., 2001). Соответственно, такая беременная имеет повышенный риск при оценке результатов БС в стандартной программе. Вполне понятно, что даже малый риск (0,2–0,5%) прерывания беременности после инвазивной ПД может быть серьезным стрессовым фактором для таких пациенток. В литературе обсуждается проблема корреляции методов стимуляции, подсадки и ведения беременности после ЭКО и показателей МСБ. Пока достоверной статистической информацией по этому вопросу мы не располагаем. Единственный способ избежать повышенного количества инвазивных ПД в указанной группе – проведение УЗИ высокого уровня для выявления УЗ-маркеров. С 1999 г. в Санкт-Петербурге после ЭКО родился 1 ребенок с СД, 2 – с СЭ. 1 плод с СД, 1 – с СЭ и 2 – с синдромом Патау были выявлены в рассматриваемой группе при кариотипировании плода по стандартным показаниям (возраст). Статистика рождения детей после ЭКО в Санкт-Петербурге официально не ведется, но по литературным данным частота рождения детей с СД среди беременных после ЭКО соответствует таковой в популяции. *Наш опыт говорит о том, что все стандартные показания к кариотипированию плода должны распространяться на беременных после ЭКО.*

7.11. ПУТИ СНИЖЕНИЯ ЧИСЛА ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Самой распространенной ошибкой при оценке результатов БС является неверное определение срока беременности. Поэтому при несоответствии уровня МСБ норме необходимо, в первую очередь, уточнить срок беременности с помощью УЗИ. Если срок беременности меньше, чем указано в направлении, то уровень ХГЧ будет завышен, а АФП соответственно занижен относительно нормы. До 30% обращений к врачу-генетику в первые годы проведения БС ограничивались пересчетом срока беременности и подсчетом риска для истинной ситуации. Если не проводилось УЗИ, можно оценивать срок беременности по первому дню последних месячных, но использо-

вание оценки срока по УЗИ повышает чувствительность биохимического скрининга на 5–6% (Wald N.J. et al., 1992b).

Влияние точности измерения концентраций маркеров на чувствительность БС исследовали путем сравнения современных характеристик скрининга и результатов БС десятилетней давности. В 470 образцах крови, в которых 10 лет назад определяли АФП с помощью РИА метода, исследовали концентрацию АФП современным, более точным методом иммунофлуорометрии. Результаты повторных измерений показали, что современные тест-системы обладают большей точностью. В результате их использования группа риска по ДЗНТ плода уменьшилась с 2,0 до 0,8%. При той же величине выявления беременных с СД у плода количество ЛПР снизилось на 1%. Таким образом, улучшение качества тест-систем приводит к небольшому, но клинически важному улучшению качества проведения БС (Wald N.J. et al., 2000).

Точность тест-систем важна в связи с тем, что погрешности измерения каждого параметра накапливаются при расчете риска на основании неточных определений маркеров. Наиболее важный критерий для принятия решений о присутствии патологии связан с дисперсией распределения. Использование комбинированных тестов приводит к сложному смешению погрешностей каждого теста.

Наиболее сложными для консультирования являются случаи пограничных значений риска по БС. Например, для беременной старшего возраста с нормальными результатами скрининга риск может варьировать от 1/125 до 1/723 из-за неточности тест-систем. Для 27-летних пациенток с показателями АФП=0,72 МоМ и ХГЧ=2,04 МоМ риск может измениться от 1/136 до 1/796. Таким образом, наибольшее внимание точности тест-систем должно уделяться в лаборатории, ведущей скрининг среди беременных старшего возраста (Benn P.A. et al., 2001). Если рассматривать два алгоритма расчета риска, примерно соответствующие друг другу по эффективности БС и числу ЛПР, то оказывается, что их результаты могут сильно варьировать для индивидуального пациента. Для минимизации ошибок в измерениях и при расчете риска авторы рекомендуют использовать «сглаживание» медиан для расчета, хорошо отлаженный и опробованный алгоритм БС, четко выверенные региональные параметры распределений МСБ по срокам беременности (Williams K.L. et al., 2000).

7.12. АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ РАСЧЕТ РИСКА

В настоящее время в ГУ НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН совместно с ООО «Мединформатика» (Санкт-Петербург) разработана и внедрена компьютеризированная программа автоматического расчета риска болезни Дауна у плода по результатам скрининга МСБ у беременных Санкт-Петербурга. Алгоритм основан на подсчете коэффициента правдоподобия, т.е. подсчете вероятности, что результаты данной беременной принадлежат к нормальному распределению, а не к распределению для плодов с СД (см. раздел 7.3). Показателем для применения инвазивной ПД с целью кариотипирования плода считается риск выше, чем 1:360 (0,28%), соответствующий риску рождения ребенка с СД у 35-летней женщины. Таким образом, с целью повышения чувствительности скрининга до 74% мы заведомо пошли на увеличение числа ЛПР до 6,7%. Следует, однако, еще раз подчеркнуть, что пороговый уровень (cut off) определяется реальными диагностическими возможностями каждого центра.

Применение программных средств позволяет вести единую базу биохимического скрининга беременных города, регистрировать исходы, анализировать причины рождения детей с хромосомной патологией и ВПР, корректировать организационные моменты взаимодействия лабораторий и клинических учреждений. Для маленьких городов, где численность беременных невелика, можно предложить сокращенный вариант нашей программы – «счетчик». Такая программа содержит только расчетную часть, не формирует базу данных и не анализирует медианы. Врач-генетик на приеме может рассчитать или откорректировать риск для пациентки на основании МСБ, указанных в МоМ или абсолютных цифрах, но медианы – базовые уровни маркеров, используемые в программе, должны быть определены заранее крупной экспертной лабораторией для беременных своего региона. При отсутствии компьютеризированной программы риск болезни Дауна у плода можно ориентировочно рассчитать, исходя из табличных данных (табл. 7.6, 7.7).

7.13. СКРИНИНГ В I ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ

В последние годы накапливается все больше данных об эффективности биохимического скрининга МСБ не только

**Риск наличия синдрома Дауна у плода в зависимости от возраста
(в годах и месяцах) на ожидаемую дату родов**

| Полных лет | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 25 | 1:1376 | 1:1372 | 1:1367 | 1:1363 | 1:1358 | 1:1353 | 1:1348 | 1:1343 | 1:1338 | 1:1333 | 1:1328 | 1:1322 |
| 26 | 1:1317 | 1:1311 | 1:1306 | 1:1300 | 1:1294 | 1:1289 | 1:1283 | 1:1277 | 1:1271 | 1:1264 | 1:1258 | 1:1252 |
| 27 | 1:1245 | 1:1239 | 1:1232 | 1:1225 | 1:1219 | 1:1212 | 1:1205 | 1:1198 | 1:1191 | 1:1183 | 1:1176 | 1:1169 |
| 28 | 1:1161 | 1:1154 | 1:1146 | 1:1138 | 1:1130 | 1:1123 | 1:1115 | 1:1107 | 1:1099 | 1:1090 | 1:1082 | 1:1074 |
| 29 | 1:1065 | 1:1057 | 1:1048 | 1:1040 | 1:1031 | 1:1022 | 1:1014 | 1:1005 | 1:996 | 1:987 | 1:978 | 1:969 |
| 30 | 1:960 | 1:951 | 1:942 | 1:932 | 1:923 | 1:914 | 1:905 | 1:895 | 1:886 | 1:877 | 1:867 | 1:858 |
| 31 | 1:848 | 1:839 | 1:829 | 1:820 | 1:810 | 1:801 | 1:791 | 1:782 | 1:772 | 1:763 | 1:753 | 1:744 |
| 32 | 1:734 | 1:725 | 1:716 | 1:706 | 1:697 | 1:687 | 1:678 | 1:669 | 1:660 | 1:650 | 1:641 | 1:632 |
| 33 | 1:623 | 1:614 | 1:605 | 1:596 | 1:587 | 1:578 | 1:570 | 1:561 | 1:552 | 1:544 | 1:535 | 1:527 |
| 34 | 1:518 | 1:510 | 1:502 | 1:494 | 1:486 | 1:478 | 1:470 | 1:462 | 1:454 | 1:446 | 1:439 | 1:431 |
| 35 | 1:424 | 1:416 | 1:409 | 1:402 | 1:395 | 1:387 | 1:381 | 1:374 | 1:367 | 1:360 | 1:354 | 1:347 |
| 36 | 1:341 | 1:334 | 1:328 | 1:322 | 1:316 | 1:310 | 1:304 | 1:298 | 1:292 | 1:287 | 1:281 | 1:275 |
| 37 | 1:270 | 1:265 | 1:259 | 1:254 | 1:249 | 1:244 | 1:239 | 1:235 | 1:230 | 1:225 | 1:221 | 1:216 |
| 38 | 1:212 | 1:207 | 1:203 | 1:199 | 1:195 | 1:191 | 1:187 | 1:183 | 1:179 | 1:175 | 1:171 | 1:168 |
| 39 | 1:164 | 1:161 | 1:157 | 1:154 | 1:151 | 1:147 | 1:144 | 1:141 | 1:138 | 1:135 | 1:132 | 1:129 |

Таблица 7.6 (окончание)

| Полных лет | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 40 | 1:126 | 1:124 | 1:121 | 1:118 | 1:116 | 1:113 | 1:111 | 1:108 | 1:106 | 1:103 | 1:101 | 1:99 |
| 41 | 1:97 | 1:94 | 1:92 | 1:90 | 1:88 | 1:86 | 1:84 | 1:82 | 1:81 | 1:79 | 1:77 | 1:75 |
| 42 | 1:73 | 1:72 | 1:70 | 1:69 | 1:67 | 1:65 | 1:64 | 1:63 | 1:61 | 1:60 | 1:58 | 1:57 |
| 43 | 1:56 | 1:54 | 1:53 | 1:52 | 1:51 | 1:49 | 1:48 | 1:47 | 1:46 | 1:45 | 1:44 | 1:43 |
| 44 | 1:42 | 1:41 | 1:40 | 1:39 | 1:38 | 1:37 | 1:36 | 1:35 | 1:35 | 1:34 | 1:33 | 1:32 |
| 45 | 1:31 | 1:31 | 1:30 | 1:29 | 1:29 | 1:28 | 1:27 | 1:27 | 1:26 | 1:25 | 1:25 | 1:24 |
| 46 | 1:24 | 1:23 | 1:22 | 1:22 | 1:21 | 1:21 | 1:20 | 1:20 | 1:19 | 1:19 | 1:18 | 1:18 |
| 47 | 1:17 | 1:17 | 1:17 | 1:16 | 1:16 | 1:15 | 1:15 | 1:15 | 1:14 | 1:14 | 1:14 | 1:13 |
| 48 | 1:13 | 1:13 | 1:12 | 1:12 | 1:12 | 1:11 | 1:11 | 1:11 | 1:11 | 1:10 | 1:10 | 1:10 |
| 49 | 1:9.5 | 1:9.2 | 1:9.0 | 1:8.8 | 1:8.5 | 1:8.3 | 1:8.1 | 1:7.9 | 1:7.7 | 1:7.5 | 1:7.3 | 1:7.1 |

Пример расчета по табличным данным.

Пациентка, 36 лет и 4 мес., АФП – 0,7 МоМ, ХГЧ – 1,5 МоМ.

$$\text{Биохимический риск} = \frac{1}{316} \cdot 1,4 \cdot 100\% = 0,44\%.$$

Таблица 7.7

Отношение правдоподобия для расчета риска синдрома Дауна у плода по уровню АФП и ХГЧ в 15–18 нед. беременности (Wald N.J. et al., 1988)

| ХГЧ, МоМ | АФП, МоМ | | | | | |
|------------|----------|------|-------|-------|-------|------------|
| | 0,4 | 0,7 | 1,0 | 2,0 | 2,5 | Нет данных |
| 0,5 | 0,53 | 0,16 | 0,078 | 0,019 | 0,012 | 0,13 |
| 0,7 | 0,92 | 0,30 | 0,14 | 0,036 | 0,023 | 0,23 |
| 1,0 | 1,7 | 0,59 | 0,30 | 0,081 | 0,053 | 0,44 |
| 1,5 | 3,9 | 1,4 | 0,75 | 0,22 | 0,15 | 1,0 |
| 2,0 | 7,3 | 2,8 | 1,5 | 0,48 | 0,33 | 2,0 |
| Нет данных | 3,2 | 1,3 | 0,77 | 0,28 | 0,2 | 1,0 |

во II, но и в I триместре беременности. В качестве биохимических маркеров используются такие белки, как свободная β -субъединица ХГЧ и ассоциированный с беременностью белок плазмы А (РАРР-А – pregnancy associated plasma protein A). На большом клиническом материале показано, что тестирование этих МСБ в сыворотке крови беременной в сочетании с данными ультразвукового обследования плода в 11–14 нед. беременности (ТВП, визуализация и длина носовой кости) может повысить выявляемость хромосомной патологии до 97% при 5% ЛПР и 90,5% при 0,5% ЛПР, т.е. превышать таковую (75%) во II триместре беременности (Cicero S. et al., 2003).

7.13.1. Маркерные сывороточные белки I триместра беременности

Ассоциированный с беременностью белок плазмы А – металлопротеиназа РАРР-А способствует клеточному росту, расщепляя белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста (Glerup S. et al., 2005).

Название РАРР-А (pregnancy associated plasma protein A) появилось в 1974 г. для обозначения специфичного для беременных гликопротеина крови. После изучения свойств и молекулярного строения белка одну из субъединиц комплекса

стали называть PAPP-A. Вторым компонентом этого комплекса соответствует предшественнику главного щелочного белка эозинофилов (major basic protein – MBP). Эти молекулы и образуют физиологически неактивную димерную форму белка, состоящую из идентичных мономеров, каждый из которых в свою очередь представлен двумя субъединицами с молекулярной массой 200 000 Да. Для PAPP-A/ргоMBP характерно постоянное нарастание концентрации в сыворотке крови женщины от 0,05 мкг/мл во время имплантации яйцеклетки до 100–150 мкг/мл к моменту родов (Bischof P., 1984). Период полураспада PAPP-A/ргоMBP в крови составляет 48–60 ч. Динамика содержания PAPP-A/ргоMBP отличается от других белков беременности, его концентрация продолжает расти после 36 нед. беременности, когда рост и развитие плаценты можно считать завершенным и уровень ряда других белков выходит «на плато». Считается, что комплекс PAPP-A/ргоMBP вырабатывается как клетками трофобласта, так и децидуальными клетками, причем источник преимущественного синтеза белка меняется в течение беременности. В настоящее время следует признать, что комплекс играет важную роль в регуляции процессов клеточного роста и межтканевых отношений трофобласта и децидуальной ткани в ходе беременности. В начале 90-х годов обнаружено снижение уровня PAPP-A при СД и другой хромосомной патологии плода (Brambati V. et al., 1993; Bersinger N.A. et al., 1994).

Свободная β -субъединица ХГЧ может выявляться в крови беременных как вследствие независимой регуляции синтеза субъединиц, так и в результате их несостоявшейся ассоциации (см. 7.2.1). Первое положение подтверждается тем, что соотношение концентраций α - и β -субъединиц ХГЧ меняется в процессе гестации, достигая пропорции 12/1 к концу беременности. Помимо этого, существуют механизмы, препятствующие образованию димерного белка, например, гипергликозилирование α -субъединицы. Дегградация ХГЧ начинается с расщепления β -субъединицы ХГЧ. При этом теряется функциональная активность и стабильность ХГЧ. Такая молекула не может взаимодействовать с рецепторами и, возможно, выступает антагонистом нативного гормона. После распада субъединиц в крови образуется свободная расщепленная молекула β -ХГЧ, которая деградирует до конечного продукта распада – β -кор фрагмента. Общая концентрация свободной

β -субъединицы ХГЧ в сыворотке крови очень низка и составляет от 1 до 3% концентрации всех форм ХГЧ, понижаясь до 0,5% к концу гестации. Гораздо выше содержание свободной β -субъединицы ХГЧ при беременности, осложненной синдромом Дауна у плода, преэклампсией и при трофобластических заболеваниях.

7.13.2. Эффективность БС в I триместре

В 1991 г. показано достоверное снижение концентрации ассоциированного с беременностью белка плазмы А (РАРР-А) в сыворотке крови в 6–12 нед. беременности при наличии трисомии 21 у плода (Brambati V. et al., 1991). Уровень свободной β -ХГЧ в крови матери при СД у плода повышается. Впервые это было показано в 1990–1991 гг. (Ozturk M., 1990; Spencer K., 1991). Для выявления эффективных МСБ I триместра был тестирован целый ряд продуктов фетоплацентарного комплекса: АФП, НЭ, интактный ХГЧ, его свободные α - и β -субъединицы, ингибин (тотальный и димерный ингА), ТБГ, СА–125 и РАРР-А. Из всех указанных маркеров только свободная β -ХГЧ и РАРР-А оказались пригодными для БС трисомии 21 у плода в I триместре беременности (Wald N.J. et al., 1997b).

Отклонения РАРР-А при СД исчезают с увеличением срока беременности, и во II триместре его уровень при хромосомной патологии плода не имеет значительных отличий от нормы (Aitken D.A. et al., 1994). Мета-анализ литературных данных позволил определить медианы для ранних сроков беременности. При СД у плода РАРР-А равен 0,35; 0,4 и 0,62 МоМ в срок 6–8; 9–11 и 12–14 нед. соответственно. Если применять единственный маркер – РАРР-А, то при 5% ЛПР можно выявить 52% беременностей с СД (Cuckle H.S., van Lith J.M., 1999).

Мета-анализ результатов 17 серий исследований, включающих 579 случаев СД, позволил вычислить медиану свободной β -ХГЧ при СД – 1,98 МоМ. Таким образом, статистическое моделирование демонстрирует 42% детекции СД при 5% ЛПР в I триместре для этого гормона (Cuckle H.S., van Lith J.M., 1999).

Изучение возможных механизмов снижения концентрации РАРР-А при хромосомной патологии привело к заключению об изменениях в посттрансляционной модификации

белка, что может быть связано с повышением его нестабильности, снижением синтеза белка или нарушением его транспорта через мембраны. Однако пока нет прямых данных, свидетельствующих о снижении экспрессии мРНК или концентрации PAPP-A в плацентарной ткани (Brizot M.L. et al., 1996). Другая гипотеза объясняет снижение уровня PAPP-A компенсационными процессами в плаценте. Предположим, что при СД у плода концентрация всех маркеров в крови матери крайне низка. С увеличением срока беременности уровень плацентарных маркеров постепенно нарастает и даже превышает нормальный, но скорость роста концентрации обратно пропорциональна молекулярной массе маркера. Соответственно, самым быстро растущим будет уровень свободной β -ХГЧ, а самым медленно растущим — PAPP-A (Bersinger N.A. et al., 1995). По оценкам разных авторов биохимический скрининг PAPP-A и своб. β -ХГЧ с учетом возраста матери позволяет выявить от 55 до 63% случаев СД у плода при 5% ЛПП (Haddow J.E. et al., 1998). Мета-анализ данных Национального цитогенетического регистра Великобритании за 1989–1996 гг. позволил рассчитать уровень спонтанных потерь при СД у плода. Оказалось, что в период от проведения хорионбиопсии до родов 43% беременностей I триместра плодом с СД заканчивается выкидышем или мертворождением, и в период от амниоцентеза до родов прерывается 23% таких беременностей. В 12% случаев роды при СД заканчиваются мертворождением или неонатальной гибелью.

Хорошо изученный УЗ-маркер I триместра — толщина воротникового пространства (ТВП) в сочетании с биохимическими маркерами существенно повышает чувствительность скрининга СД (см. главу VIII). Результаты комбинированного (УЗ + БС) скрининга на СД по данным ретроспективных исследований различаются и, в среднем, составляют 82,5% при 5% ЛПП (Wald N.J., Hackshaw A.K., 1997; Spencer K. et al., 1999).

Данные последних девяти серий проспективного комбинированного скрининга в I триместре (всего обследовано около 59 000 женщин, из них 262 беременности с СД) показали среднюю чувствительность 89% (или 80% — с учетом спонтанного прерывания плодов с СД) при 6,4% ложноположительных результатов (Krantz D. et al., 2000; Nieminaa M. et al., 2001; Schuchter K. et al., 2002; Spencer K. et al., 2003b; Nicolaides K.H. et al., 2005).

Комбинированный ультразвуковой и биохимический скрининг показал чувствительность 91% при 2,1% ЛПР, низкие (менее 0,4 МоМ) значения белков наблюдались у 0,4% обследованных и включали все случаи триплоидии и трисомий 18 и 13 (Wojdemann K.R. et al., 2005). В Англии провели массовое мультицентровое исследование, посвященное оценке характеристик комбинированного скрининга в I триместре беременности и применению нового двухстадийного подхода к оценке индивидуального риска. При обследовании 75821 беременной в сроки с 11 до 13 нед. и 6 дней рекомендовали проведение хорионбиопсии всем беременным с риском более 1/100. При пограничном риске (пороговым считался риск 1/100 и более) повторно оценивали дополнительные УЗ параметры. Хромосомные аберрации выявили в 544 случаях, включая 325 случаев СД. Риск 1/300 и больше выявлен в 5,2% беременностей нормальным плодом, в 92,6% – при СД у плода, в 88,5% – с трисомией 18 и трисомией 13, а также у 85,6% беременных с другими хромосомными патологиями. Выявляемость женщин группы высокого риска по СД у плода снижается до 80 и 75% при 2% и 1% ЛПР соответственно. Индивидуальный подход с учетом результатов УЗИ позволяет повысить чувствительность БС до 92–94% при числе ЛПР от 2,1 до 2,7 (Nicolaides K.H. et al., 2005).

В другом исследовании (Spencer K., Nicolaides K.H., 2002a) у 5084 беременных в 11–13 нед. определяли ТВП, уровни PAPP-A и свободной β -ХГЧ. К группе высокого риска относили женщин с риском 1/250. Из 59 пациенток, которые прошли БС в 9–10 нед., при повторном визите в 25 случаях ТВП измерить не удалось. Достигнута 93% чувствительность БС на СД (14 из 15 или 15 из 16 с учетом одного мозаичного транслокационного случая). ЛПР составили 5,5% – 274/4974. Кроме того, были выявлены 5 из 6 женщин с плодом с синдромом Эдвардса, одна из двух с синдромом Патау, а также единственный случай триплоидии. ЛПР для скрининга синдромов Эдвардса и Патау составили 0,4%. С учетом выживаемости плодов с СД чувствительность БС составила 89%. Медиана ТВП для трисомий 18 и 13 в 45 случаях составила 2,819 МоМ, свободной β -ХГЧ и PAPP-A – 0,375 и 0,201 МоМ соответственно.

Таким образом, *многими исследованиями установлено, что эффективность комбинированного скрининга в I триместре превышает чувствительность скрининга во II триместре. Сле-*

дует, однако, учитывать, что часть плодов с СД погибает до конца беременности, что отчасти и поясняет высокую частоту выявления плодов с СД в I триместре.

7.13.3. Алгоритм обследования беременных в I триместре

С 2003 г. в Санкт-Петербурге начаты исследования PAPP-A и свободной β -ХГЧ с целью получения нормальных значений распределений маркеров в I триместре беременности. Обследовано более 1000 беременных при сроках с 9 до 14 нед. УЗИ всем обследованным проводилось одним специалистом на одном оборудовании. Определение уровней PAPP-A и свободной β -ХГЧ осуществлялось иммунофлуорометрическим методом с помощью тест-систем фирмы Валлак (ООО «Приборы», Москва). Для расчета биохимического и комбинированного риска использовали программу пренатального скрининга Life Cycle. Средний возраст обследованных пациенток составил $32,6 \pm 5,64$ года (от 19 до 47 лет). В исследуемую группу вошло также 29 беременных с нарушениями кариотипа плода. ПД проводилась по стандартным показаниям (см. главы V, X). Чувствительность биохимического скрининга для всех хромосомных аномалий в I триместре составила 63%, комбинированного – 87% при 12,9% ЛПР. Выявляемость СД составила 86% для БС и 82% для комбинированного скрининга соответственно (Кашеева Т.К., Некрасова Е.С., 2005) и была выше, чем при скрининге во II триместре (Кашеева Т.К. и др., 2004). Большое число ложноположительных результатов связано с тем, что 35% обследованных составляли беременные высокого риска (старше 35 лет), для молодых пациенток величина ЛПР составила 4,7%. Требуется дальнейшие исследования для оценки эффективности комбинированного скрининга среди молодых женщин, у которых в нашей работе был выявлен только один случай СД.

7.14. БС и клиника одного дня

В связи с появлением современной аппаратуры и возможности быстрого получения результатов БС родилась идея организации клиники одного дня (OSKAR – one-stop clinic for assessment of risk). Согласно этой программе после консультации беременной проводится биохимический анализ крови на содержание PAPP-A и свободной субъединицы β -ХГЧ, УЗИ

плода и затем заключительная консультация с оценкой комбинированного риска. Все обследование занимает 1 ч. В такой клинике обследовали 12339 беременных в 10–14 нед. беременности. В группу повышенного риска отбирали пациенток с риском более 1/300 для трисомий 21, 18 и 13. 97,5% беременных прошли такой скрининг, 77% женщин группы высокого риска согласились на инвазивную ПД. Выявлено 92% плодов с СД (23/25), и 100% (15 случаев) трисомий 18 и 13, всего – 96% хромосомных аномалий (49 из 51). ЛПР составили 5,2% (Spencer K. et al., 2003b). Таким образом, скрининг хромосомной патологии может эффективно проводиться в многопрофильной клинике одного дня. В подобном центре выявлено 75 из 82 случаев СД (91,5%) и 54 из 61 (88,5%) других хромосомных аномалий при 6,8% (947 из 14020) ЛПР. В настоящее время клиника одного дня рассматривается как одно из весьма перспективных направлений рациональной организации службы пренатальной диагностики (Bindra R. et al., 2002).

7.14. ИНТЕГРАЛЬНЫЙ ТЕСТ

Интегральный тест основан на исследовании биохимических и УЗ-маркеров как в I, так и во II триместрах беременности. Через 3–4 нед. после первого тестирования (ТВП и PAPP-A) исследуются уровни АФП, ХГЧ и НЭ (желательно с ингибином А), после чего рассчитывается совокупный риск наличия хромосомных болезней у плода по всем биохимическим данным с учетом величины ТВП и возраста женщины. Чувствительность может составить 94 и 85% (при величине ЛПР 5 и 1%). Ретроспективный анализ результатов исследования сыворотки 927 беременных показал, что при пороговом риске 1/350 число ЛПР составило 1,5% – в I триместре, 3,6% – во II и 0,54% – для интегрального теста (Canini S. et al., 2002). Преимущество интегрального теста заключается в самом низком числе ложноположительных результатов (до 1%) (Wald N.J. et al., 1999a). Проведение скрининга предполагает, что пациентам не сообщаются промежуточные результаты до завершения обследования во II триместре. Только у небольшого числа беременных высокого риска в I триместре риск подтверждается при БС во II триместре (Hackshaw A.K., Wald N.J., 2001). Последовательный скрининг, т.е. ПД для группы риска в I триместре, затем скрининг во II, связан с повышением количества ЛПР, при этом положительная предсказательная

величина во II триместре будет низкой, так как большинство больных СД уже выявлено (Cuckle H.S., 2001; Nerman A. et al., 2002). Если интегральный скрининг не проводится с единым расчетом риска, то беременной советуют участвовать в обоих обследованиях. Таким образом, высокая эффективность нивелируется отсутствием диагноза и стоимостью повторных визитов. Окончательные выводы по эффективности интегрального скрининга смогут дать мультицентровые проспективные исследования, которые проводятся уже несколько лет в Англии и США.

7.15. КОМПРОМИССНЫЕ ВАРИАНТЫ ОБСЛЕДОВАНИЯ

Если УЗИ труднодоступно (например, в отдаленных районах), то для скрининга возможны комбинированные подходы – селективное УЗИ только для тех беременных, которые не помнят даты последних месячных или у которых нерегулярный цикл. При определении срока беременности с помощью УЗИ эффективность БС возрастает на величину до 7,1% в зависимости от комбинации МСБ и порогового риска. При этом доля ложноположительных результатов снижается на 0,2–1,1%. Селективное УЗИ беременных с неопределенной датой последних месячных повышает эффективность БС на 2,6–4,6% и снижает ложноположительные результаты на 0,04–0,6%. Некоторые центры используют УЗИ только в случае расхождения акушерского срока беременности с менструальным более, чем на неделю. Такой подход снижает выигрыш в уровне детекции до 2,5–4,6%, а ложноположительные результаты снижаются на 0,06–0,6% (Rahim R.R. et al., 2002).

7.16. АКУШЕРСКИЕ АСПЕКТЫ БС

II триместр. Отметим особенность, которую редко подчеркивают авторы и практически не замечают акушеры-гинекологи в своей повседневной практике: как резкое повышение МСБ, так и их понижение сигнализируют о патологическом течении беременности (угроза прерывания беременности, наличие генитальных инфекций и др.), что диктует углубленное обследование этой беременной с проведением соответствующего лечения (Кашеева Т.К. и др., 1999). В 80–95% случаев изменения АФП связаны с наличием акушерской патологии у матери. Неблагоприятный прогноз для сохранения

беременности возникает как при гипосекреции ХГЧ, так и при гиперсекреции или резких колебаниях уровня гормона (Светлаков А.В. и др., 1997). Беременные с повышенным (более 2 МоМ) содержанием АФП или ХГЧ в крови по результатам биохимического скрининга в 15–18 нед. относятся к группе высокого риска по развитию плацентарной недостаточности и гипотрофии плода и нуждаются в дополнительном обследовании и профилактике данных акушерских осложнений (Гагарина А.В. и др., 2002).

Беременные, у которых в скрининговые сроки отмечается повышение ХГЧ, относятся к группе повышенного риска преждевременных родов и нуждаются в профилактике невынашивания. Отмечено, что одной из возможных причин повышения уровня ХГЧ может быть мозаицизм хромосом, ограниченный плацентой (см. главу X), являющийся фактором риска преждевременных родов и плацентарной недостаточности на фоне нарушений созревания плаценты и изменения маточно-плацентарной гемодинамики (Кузнецова Т.В. и др., 2002). В последних работах подтверждается, что среди беременных с высоким содержанием ХГЧ и АФП и аномальными показателями гемодинамики наблюдается высокий уровень неблагоприятных исходов беременности (Audibert F., 2005).

У беременных, попавших как в группу риска по СД, так и по ДЗНТ, наблюдается повышение вероятности обнаружения у плода других ВПР в 14,5 раз, других хромосомных аномалий – в 36,3. Преэклампсия встречается чаще в 6,7 раза, маловесные дети – в 9,7 раз, преждевременные роды – в 5,9, выкидыши или внутриутробная гибель плода в 11,8 раза, чем у женщин с нормальными параметрами МСБ (Chitayat D. et al., 2002). С учетом всех 4 показателей II триместра, веса беременной и статуса курильщика можно предсказать 23% случаев рождения маловесных детей (менее 2500 г) и 39% – очень низкого веса (менее 1500 г). На основании анализа исходов беременностей у 42259 женщин, участвовавших в скрининге, сделан вывод, что женщинам, попавшим в группу риска по БС, рекомендуется профилактика гипотрофии плода (Huang T. et al., 2003).

1 триместр. Работы последних лет свидетельствуют о том, что биохимический скрининг в I триместре эффективно выявляет не только хромосомную патологию, но и группу высокого риска по осложнениям беременности. Подобных пуб-

ликаций много, но их результаты противоречивы. При ретроспективном анализе исходов беременностей показано, что у 60 беременных с развившимся впоследствии гестозом (преэклампсией) показатели среднего уровня ХГЧ и ингибина А были достоверно повышены (1,36 и 1,4 МоМ). Если рассчитать риск по двум маркерам, то примерно 23% случаев гестозов могут быть предсказаны еще в 16 нед. беременности с 95% вероятностью (Lambert-Messerlian G.M. et al., 2000).

Важное прогностическое значение имеет и изучение уровня белка, ассоциированного с беременностью – РАРР-А. Так, при анализе исходов родов 8012 женщин, обследованных в I триместре с помощью комбинированного УЗ и БС, было установлено, что вероятность задержки развития плода повышается в 5,4 раза, если содержание РАРР-А ниже 1-го перцентиля и в 2,7 раза, если уровень свободной β -ХГЧ ниже 1-го перцентиля. Преждевременные роды (ранее 34 нед.) наступают в 2,3 раза чаще у беременных, в крови которых уровень РАРР-А ниже 5-го перцентиля и в 3,5 раза – если содержание свободной β -ХГЧ выше 99-го перцентиля (Krantz D.A. et al., 2004). При сравнении группы из 2097 беременных с нормальными показателями МСБ и 216 беременных с достоверными отклонениями содержания РАРР-А и свободной β -ХГЧ отмечено увеличение числа неблагоприятных исходов беременности во 2-й группе в 2,4 раза а для спонтанных абортотв и предлежания плаценты – в 11 раз и в 4,3 раза соответственно (Liu S. et al., 2004). При анализе исходов 1779 беременностей в Швейцарии было отмечено повышение доли угрожающих состояний при высоких показателях ХГЧ и увеличение частоты спонтанных абортотв и преждевременных родов – при низких уровнях РАРР-А (Kabili G. et al., 2004).

Имеются также данные, что изолированное повышение содержания свободной β -субъединицы ХГЧ не является указанием на повышенный риск развития гестоза и других осложнений беременности (Brajeponic-Milic et al., 2004). Не имеет прогностической значимости для этих осложнений беременности и такой УЗ-маркер I триместра, как ТВП (Tsai M.S., 2002). С другой стороны, ТВП более 99-го перцентиля и свободная β -ХГЧ менее 1-го перцентиля ассоциированы с увеличением числа выкидышей в три и более раз (Dugoff L. et al., 2004).

Содержание ингибина А и его α -субъединицы значительно выше в крови беременных с гестозом по сравнению с нормально протекающей беременностью (Fraser R.F. et al., 1998). По сравнению с нормотензивными случаями уровень активина А в I триместре беременности оказался достоверно выше у 131 беременной с развившимся позже гестозом и у 77 – с гипертонией (1,49 и 1,32 МоМ) по сравнению с нормой (1,0 МоМ) (Ong C.Y. et al., 2004).

Продолжаются активные поиски новых маркеров, позволяющих предсказать неблагоприятный исход беременности. Например, установлено, что в моче беременных с риском гестоза снижается уровень плацентарного фактора роста и проангиогенного белка (Lambert-Messerlian G.M. et al., 2004). Изменяется также уровень кортикотропин-рилизинг гормона и его связывающего белка (Florio P. et al., 2004). Еще одним ранним перспективным прогностическим признаком гестоза является повышение содержания фетальной ДНК в крови матери. Увеличение концентрации ДНК плода в периферической крови матери в 15 нед. беременности ассоциировано с 8-кратным увеличением риска гестоза (Cotter A.M. et al., 2004). За 3 нед. до проявления признаков гестоза у 43 беременных уровень фетальной ДНК увеличивался в 4 раза (Sekizawa A. et al., 2004). Естественно, что детальное рассмотрение этого круга вопросов выходит за рамки данной монографии.

7.17. АЛГОРИТМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ СЛУЖБ ГОРОДА В ПРОГРАММЕ ПРОФИЛАКТИКИ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ

Успешная реализация профилактической программы возможна только при четкой отработке алгоритма взаимодействия всех учреждений, задействованных в осуществлении скрининга: акушерско-гинекологических ЛПУ, лаборатории, осуществляющей пренатальный скрининг, медико-генетического центра, кабинетов ультразвуковой диагностики, центров планирования семьи, лаборатории пренатальной диагностики, патолого-анатомической службы. Основой успешной работы является понимание профилактической направленности действий и сути биохимического скрининга врачами женских консультаций. Схема алгоритма биохимического скрининга в I триместре, а также алгоритм комбинированного БС в I и II триместрах, разработанные и внедренные

в практику службы ПД Санкт-Петербурга приведены на рисунках 7.1, 7.2. При первом обращении беременной в женскую консультацию врач сообщает ей о возможности проведения биохимического скрининга на хромосомную патологию как в I, так и во II триместре беременности, информирует о необходимых дальнейших действиях по результатам БС. *Комплексная система обследования беременных приводит к повышению эффективности инвазивной пренатальной диагностики, возможности индивидуального подбора оптимального алгоритма ведения беременной и, в целом, к снижению перинатальной смертности в регионе.*

7.18. ПЕРСПЕКТИВЫ БИОХИМИЧЕСКОГО СКРИНИНГА **Новые маркеры: уровень свободной ДНК плода** **в крови матери, АДАМ12, проМБП**

Поиск новых биохимических маркеров, отклонение которых позволит лучше оценить состояние плода, привел к исследованию концентрации свободной ДНК в крови матери. Этот параметр определялся только у плодов мужского пола, и уровень ДНК плода в крови у 15 беременных с СД у плода оказался в 1,7 раза выше, чем с нормальным кариотипом. Чувствительность данного маркера достигает 21% при 5% ЛПР. Если добавить такое исследование к квадрато-тесту БС, чувствительность увеличивается с 81 до 86% при том же числе ЛПР (5%). Дальнейшее совершенствование этого метода, в частности, возможность точно измерять концентрацию свободной фетальной ДНК в крови матери при женском поле плода могло бы существенно увеличить информативность такого теста (Farina A. et al., 2003). Отметим, что такая «флотирующая» в крови матери ДНК и РНК плода в настоящее время начинает использоваться и для прямой неинвазивной диагностики хромосомных болезней плода (см. главу XV).

Наиболее интересным новым маркером хромосомной патологии является белок АДАМ-12 (A disintegrin and metalloprotease). Белок представляет собой ассоциированную с беременностью металлопротеазу, расщепляющую белки связывания инсулиноподобного фактора роста (ИПФР). Методом Вестерн-блота АДАМ-12 определяется в сыворотке крови у беременных, но отсутствует у небеременных женщин (Shi Z. et al., 2000). Большие количества мРНК АДАМ-12 обнаруживаются в плаценте (Gilpin B.J. et al., 1998). Впервые его пред-

ложили использовать для БС в 2003 году, когда были обнаружены достоверные отличия уровня ADAM-12 в I триместре при СД у плода (Laigaard J. et al., 2003).

Комбинация различных маркеров при фиксированном количестве ЛПР (5%) позволяет получать следующие результаты: чувствительность комбинированного теста в I триместре достигает 76%, интегрального теста (ТВП, PAPP-A, АФП, ХГЧ, НЭ и инГА) 86%. Чтобы выявить 90% СД, надо учитывать ТВП, свободную β -ХГЧ, уровень проМБП и АФП – во II триместре. Если же исследование проМБП объединить с тройным тестом во II триместре, то чувствительность повышается с 62 до 83%, т.е. становится выше, чем при использовании инГА (чувствительность до 69%) (Rode L. et al., 2003).

Наиболее многообещающим в плане повышения эффективности обещает быть скрининг 6 маркеров: АФП, ХГЧ, свободная β -ХГЧ, PAPP-A, проМБП и ТБГ. Анализ 156 образцов материнской крови при СД у плода и 546 контрольных образцов показал, что при определенной комбинации маркеров можно получить чувствительность 73, 69 и 60% при 5% ЛПР. При добавлении исследования ТВП и пороге отбора группы риска 1/400 чувствительность можно повысить до 86, 83 и 82 с ЛПР 4,3; 4,1 и 3,8% соответственно (Christiansen M. et al., 2004).

Разработка экономически оправданной стратегии скрининга для конкретного региона

В современных условиях одним из важных факторов проведения профилактических медицинских мероприятий является экономическая обоснованность. Датские ученые предлагают свою экономически оправданную модель скрининга. Биохимический скрининг осуществляется в раннем I триместре, исследование ТВП проводится только группе с пограничным риском (менее 1/65 и более 1/1000). ТВП определяется только для 19,4% беременных из группы пограничного риска. С помощью статистических методов строится модель распределения, которая соответствует чувствительности 78,9% при 4,0% ЛПР. При стандартном скрининге чувствительность составляет 85,5% и ЛПР – 4,4%. Снижение исследования ТВП ведет к повышению числа рожденных детей с СД с 23 до 29%. Стоимость одного предупрежденного случая СД в такой программе составила 53 000 фунтов стерлингов (91 000 фунтов – для обычного варианта) (Christiansen M., Larsen S.O., 2002).

Вариант измерения ТВП вместе с повторным определением НЭ и PAPP-A в I и II триместре обеспечивает 85% детекцию при 0,3% ЛПР, что сравнимо с интегральным скринингом – 85% при 1,2% ЛПР (Wright D.E., Bradbury I., 2005).

Таким образом, эффективность биохимического скрининга может повышаться как за счет увеличения количества используемых маркеров, их оптимального подбора, так и за счет снижения числа ложноположительных результатов путем использования комбинации различных маркеров в I и II триместрах. Максимальная эффективность достигается в тех исследованиях, где четко продумана организация проведения биохимического скрининга и стандартизованы требования к ультразвуковым параметрам, используемым в комбинированном скрининге.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время разработаны и широко используются в ПД стандартные варианты скрининга МСБ во II триместре, комбинированного (УЗ + МСБ) в I триместре и интегрально-го скрининга (I + II триместры). Выбор варианта БС определяется организационными, финансовыми, внутренними и даже национальными особенностями организации системы здравоохранения и служб ПД каждой страны.

Во II триместре исследование маркерных белков сыворотки крови беременных обеспечивает формирование группы женщин высокого риска по рождению детей с ДЗНТ и рядом других ВПР, а также по наличию синдрома Дауна у плода. Для ДЗНТ чувствительность скрининга достигает 98% при анэнцефалии и 90% для спинномозговой грыжи открытого типа. При СД чувствительность биохимического скрининга достигает 67–72% при 5–6% ложноположительных результатов. В I триместре чувствительность БС повышается до 88–90% (часть плодов с СД не доживают до 16 нед.). Наименьшее число ложноположительных результатов достигается при комбинированном подходе с учетом УЗ-маркеров (толщины воротникового пространства и длины носовой кости). При нормальном кариотипе плода беременные со значимыми отклонениями маркерных белков составляют группу повышенного риска по развитию плацентарной недостаточности и гипотрофии плода и нуждаются в дополнительном обследовании и проведении профилактики акушерских осложнений.

Рассмотрены перспективы дальнейшего совершенствования программ биохимического скрининга с целью повышения эффективности отбора женщин группы высокого риска врожденной и наследственной патологии плода.

akusher-lib.ru

ГЛАВА VIII. УЛЬТРАЗВУКОВОЙ СКРИНИНГ

Ультразвуковое исследование (УЗИ) является основным прямым неинвазивным методом пренатальной диагностики (см. главу VI). УЗИ позволяет не только установить наличие беременности, но и наблюдать за процессами роста и развития эмбриона, своевременно выявлять замершую беременность, внематочную беременность, установить причину кровянистых выделений, заподозрить наличие хромосомной патологии плода. УЗИ является единственным методом, позволяющим выявить пороки развития плода. Безопасность УЗИ при беременности, начиная с ее ранних сроков, подтверждена исследованиями Американского института ультразвука в медицине, в ходе которых не было установлено каких-либо изменений тканей и клеток млекопитающих при облучении их ультразвуком подобной интенсивности. При использовании этого метода на протяжении более 20 лет не было получено данных о возникновении каких-либо осложнений у плода.

В соответствии с рекомендациями Европейской ассоциации по перинатальной медицине во время беременности рекомендуется проведение трех УЗИ. Выполнение УЗИ в оптимальные для этого сроки позволяет исключить большинство пороков развития у плода и выявить маркеры хромосомной патологии. Для каждого срока существуют четкие цели и задачи УЗИ, а также рекомендации по дальнейшему ведению беременности при наличии ВПР или маркеров хромосомной патологии плода. Европейской ассоциацией по перинатальной медицине одобрена следующая стратегия:

- Каждой беременной рекомендовано трехкратное УЗИ плода (*1-й уровень*).

Цель исследования – оценка общего состояния плода, его соответствия сроку беременности, определение числа плодов, расположения плаценты и объема околоплодных

вод. Основная задача – определение нормы или наличия отклонений от нормы. Так как УЗИ 1-го уровня предполагает общее акушерское УЗИ, оно выполняется врачами женских консультаций, хозрасчетных поликлиник и центров, осуществляющих ведение беременных, а также гинекологических стационаров.

- Специализированное пренатальное ультразвуковое исследование (**2-й уровень**).

Его целью является детальное изучение анатомии плода для выявления любых видов нарушений развития и проведения общей синдромальной диагностики. Задача исследования – разрешение всех вопросов относительно наличия (или отсутствия) нарушений развития плода, ранее обнаруженных на 1-м уровне. Исследования второго уровня выполняют врачи, прошедшие специализацию по ПД врожденных нарушений развития плода (специализированные учреждения или отделения).

- Беременные групп высокого риска должны быть определены на первом уровне ультразвукового скрининга и более детально обследованы на втором уровне.

- Обследованию на **3-м уровне** подлежат беременные с неоднозначными результатами, полученными на предыдущих уровнях, особенно при подозрении на наличие у плода аномалий развития сердечно-сосудистой и нервной систем. Экспертное пренатальное ультразвуковое исследование выполняется с целью установления окончательного диагноза и способствует выработке оптимальной тактики дальнейшего ведения беременности. Исследования на этом уровне должны выполнять врачи УЗД, прошедшие специализацию в области пренатальной диагностики врожденных нарушений развития плода и имеющие опыт использования новейших технологий и специальных методов исследования (доплерометрия, эхокардиография, нейросонография). Оценка результатов исследования на 3-м уровне должна проводиться совместно с генетиками, неонатологами, педиатрами, детскими хирургами, кардиологами и другими специалистами.

Данные рекомендации были учтены при составлении Приказа №457 МЗ РФ от 28.12.2000 г., касающегося дальнейшего совершенствования ПД в РФ.

В настоящее время согласно Распоряжению №45 от 21.02.2005 г. в Санкт-Петербурге введена программа обязатель-

ного ультразвукового скрининга, которая включает три исследования при сроках беременности 10–14, 18–22 и 32–34 нед.

8.1. СКРИНИНГОВЫЕ УЛЬТРАЗВУКОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В 10–14 НЕДЕЛЬ БЕРЕМЕННОСТИ

При ультразвуковом исследовании в 10–14 нед. определяется жизнеспособность плода, число плодов в матке, уточняется срок беременности (что важно для оценки результатов биохимического скрининга в 15–18 нед. беременности и оценки темпов роста плода при последующем проведении ультразвуковых исследований), исключаются грубые анатомические пороки развития и определяются маркеры хромосомной патологии. Разработаны стандартные протоколы УЗ исследования плода в I триместре беременности (Приказ №457 МЗ РФ от 28.12.2000 г.).

При проведении скринингового ультразвукового исследования в I триместре оценивается состояние следующих анатомических структур: головной мозг («фигура бабочки»), сердце, передняя брюшная стенка, позвоночник, верхние и нижние конечности. Детально методика обследования и эхографическое изображение как нормальных анатомических структур плода, так и патологических, представлены в специализированных руководствах (Снайдерс Р.Дж.М., Николаидес К.Х., 1997; Nicolaides K.N. et al., 1999; Юдина Е.В., Медведев М.В., 2002).

При проведении скринингового ультразвукового исследования в I триместре необходимо уделять внимание такой экстраэмбриональной структуре, как желточный мешок. Эхографически желточный мешок представляет собой округлое анэхогенное образование диаметром 4–5 мм, расположенное в целомической полости. К концу I триместра беременности наблюдается обратное развитие желточного мешка, и после 12 нед. он уже, как правило, не визуализируется. Отсутствие эхографического изображения желточного мешка до 12 нед. или его преждевременное исчезновение является неблагоприятным прогностическим признаком и часто отмечается при самопроизвольном прерывании беременности. При увеличении или уменьшении размеров желточного мешка также увеличен риск самопроизвольного прерывания беременности, наличия хромосомной патологии (Юдина Е.В., Медведев М.В., 2002) или множественных пороков развития плода (Некрасова Е.С. и др., 2004).

К маркерам хромосомной патологии плода в I триместре беременности относятся толщина воротникового пространства и визуализация носовых костей плода.

8.1.1. Толщина воротникового пространства (ТВП) плода

В начале 90-х годов в небольших сериях исследований беременных групп высокого риска хромосомной патологии у плода сообщалось о существовании возможной связи между гипозехогенной структурой в воротниковой зоне плода с 10-й по 14-ю неделю беременности и наличием у него хромосомной патологии (Nicolaides K.N. et al., 1992). Описанное образование получило название «воротниковое пространство» (ВП). ТВП — это максимальная величина эхонегативного участка между кожей плода и мягкими тканями, окружающими шейный отдел позвоночника (см. рис. 8.1, 8.2, 8.3). Она измеряется в продольном сечении плода, при котором определяют величину копчико-теменного размера (Nicolaides K.N. et al., 1992). ВП наблюдается у плодов как с нормальным, так и с патологическим кариотипом. Чаще всего оно самостоятельно исчезает во II триместре и редко приводит к образованию шейного отека или генерализованного отека плода.

Учитывая важное диагностическое значение этого маркера, его измерение требует соблюдения четких правил. При измерении необходимо дождаться спонтанного шевеления плода, при котором он отодвинется от амниотической оболочки. В I триместре кожа плода и амниотическая оболочка визуализируются в виде тонких мембран, и для их дифференцировки требуется аккуратность и точность. Измерение должно проводиться строго в продольном сечении. Изображение должно быть



Рис. 8.1. Измерение толщины воротникового пространства плода (схема).



Рис. 8.2. Воротниковое пространство (ультразвуковое исследование).



Рис. 8.3. Увеличение толщины воротникового пространства (3,6 мм).

увеличено таким образом, чтобы на экране оставалась только голова и верхняя часть грудной клетки плода. ТВП измеряется в самом широком месте. Курсоры устанавливаются на внутренние границы эхопозитивных линий, представляющих собой кожу и мягкие ткани плода, окружающие позвоночник (рис. 8.2).

Скрининг хромосомных болезней по ТВП у плода в 10–14 нед. беременности дает возможность выявить до 80% плодов с хромосомной патологией. Согласно обобщенным данным многих исследователей, положительным результатом скрининга считается значение ТВП более 2,5 или 3,0 мм (Wald N.J. et al., 1998). Систематический обзор литературы, посвященный определению эффективности скрининга ТВП в I триместре беременности, был предпринят в 1998 г. группой английских исследователей (Wald N.J. et al., 1998). Был сделан вывод, что скри-

нинг по ТВП имеет высокую чувствительность, однако результаты, полученные в разных диагностических центрах, имеют значительные отличия. Так, например, при проведении скрининга по ТВП в группе женщин высокого риска по возрасту перед выполнением инвазивной диагностики сообщается о 100% выявлении плодов с синдромом Дауна (7/7) при частоте ложноположительных результатов 1,0% (1/105) (Szabo J., Gellen J., 1990). Такой авторитет в ультразвуковой пренатальной диагностике, как Кипрос Николаидес, сообщает о выявлении 84% плодов с синдромом Дауна (21/25) при частоте ложноположительных результатов 4,5% (55/1227) (Nicolaides K.N. et al., 1994). При этом другие исследователи не выявили ни одного плода с синдромом Дауна (0/1) при частоте ложноположительных результатов 5,0 (13/260) (Kornman L.H. et al., 1996).

При проведении скрининга по ТВП у женщин, не входящих в группу риска по рождению ребенка с хромосомной патологией, разброс данных по эффективности этого маркера также весьма значителен (от 67 до 100%) (Bewley S. et al., 1995; Kornman L.H. et al., 1996; Szabo J. et al., 1995).

Такой разброс результатов мог быть обусловлен несколькими причинами. Во-первых, во всех приведенных исследованиях использовали фиксированное значение ТВП и не принимали во внимание срок беременности. Между тем известно, что с каждой неделей беременности толщина воротникового пространства увеличивается в среднем на 17% (Schuchter K. et al., 1998). Соответственно, разные сроки беременности при проведении скрининга по ТВП могут обуславливать различия в частоте выявления плодов с синдромом Дауна. Так, значение ТВП 2,9 мм является высоким для плода в 10 нед. беременности (95-я перцентиль – 2,6 мм), в то время как для плода в 13 нед. то же значение ТВП не будет выходить за 95-ю перцентиль (3,01).

Для улучшения стандартизации результатов ТВП скрининга предложено пользоваться не абсолютными, а относительными (перцентильными) значениями ТВП для каждой недели беременности. По предложению Николаидеса и соавт. (Nicolaides K.N., et al., 1996) *предложено выразить значение ТВП как стандартное отклонение от нормы для данного значения копчико-теменного размера плода*. При выбранном пороге риска рождения ребенка с хромосомной патологией «cut-off» 1:300 и выше (см. главу VII) было выявлено 84% плодов с хромосомной патологией при частоте ложноположительных результатов 5,8%.

Таким образом, ультразвуковой скрининг хромосомной патологии плода вполне возможен в конце I триместра беременности. При этом, в отличие от биохимического скрининга (см. главу VIII), он позволяет произвести все необходимые измерения и определить степень риска в течение одного визита.

По мнению некоторых авторов, при ультразвуковом исследовании далеко не всегда можно корректно измерить значение ТВП. Так, сообщалось, что примерно в 18% случаев невозможно измерить ТВП. Это было связано с проведением ультразвукового исследования до 8-й или после 13-й недели беременности, с особенностями положения плода в матке и даже с выраженной толщиной подкожной жировой клетчатки матери (Haddow J.E., Palomaki G.E., 1996; Roberts L.J. et al., 1995) Увеличить частоту корректного измерения ТВП можно при повторном УЗ осмотре.

Весомым доводом в пользу ультразвукового скрининга в I триместре беременности является более высокая митотическая активность клеток хориона, что существенно облегчает кариотипирование плода. Немаловажным фактором является также значительно меньшее травмирование и существенно более низкий риск осложнений в случае медикаментозного прерывания беременности при выявлении плода с хромосомной патологией в I триместре.

Согласно данным нашей лаборатории (Некрасова Е.С., 2005), при использовании в качестве маркера хромосомной патологии плода значения ТВП более 2,5 мм выявляется 74% плодов с хромосомной патологией, в том числе 66% плодов с болезнью Дауна, при частоте ложноположительных результатов 2,2%. Чувствительность и специфичность данного метода скрининга равны 73,9 и 97,7% соответственно. Прогностическое значение положительного и отрицательного результатов теста составили 42,5 и 99,4% соответственно. При использовании в качестве маркера хромосомной патологии плода значения ТВП более 95 перцентили не было получено преимуществ в частоте выявления плодов с хромосомной патологией, тогда как частота ложноположительных результатов выросла до 3,8%.

8.1.2. Отсутствие визуализации носовых костей плода

Описание внешности пациента с трисомией 21-й хромосомы впервые было представлено еще в 1866 г. Л.Дауном (Down L.J., 1866). Именно этот английский врач впервые об-



Рис. 8.4. Гипоплазия носовых костей у плода с трисомией 13 (длина НК – 1,9 мм).

ратил внимание, что характерной особенностью таких пациентов является плоское широкое лицо и небольшой нос. Однако долгое время при проведении ультразвукового скрининга хромосомной патологии не производилась оценка носовых костей плода.

В последнее время в зарубежной литературе появились единичные публикации, посвященные существованию связи между отсутствием визуализации носовых костей у плода в конце I триместра беременности и болезнью Дауна.

При ультразвуковом исследовании визуализация носовых костей производится в продольном сечении плода, в котором происходит определение копчико-теменного размера и ТВП (рис. 8.4). Изображение необходимо увеличить таким образом, чтобы на экране оставалась только голова и верхняя часть грудной клетки плода. Угол инсонации между ультразвуковым лучом и продольной осью туловища плода должен составлять 45° . При этом необходимо дифференцировать носовые кости от кожи, которая представлена более тонкой эхогенной полоской, расположенной над более толстой и более эхогенной носовой костью (Cicero S. et al., 2003a). Считается, что для обучения данной методике необходимо выполнение от 40 до 120 сканирований (Cicero S. et al., 2003b). Оценка наличия или отсутствия носовых костей в 11–14 нед. беременности практически не требует дополнительного времени в хо-

де стандартного скринингового ультразвукового исследования (Kanellopoulos V. et al., 2003).

При ультразвуковом исследовании с 11-й по 14-ю неделю беременности носовые кости не определялись у 73% плодов с болезнью Дауна. У плодов с нормальным кариотипом носовые кости определялись в 99,5% случаев (Cicero S. et al., 2001). Обследование 194 плодов пациенток группы высокого риска по рождению ребенка с хромосомной патологией показало, что носовые кости не определялись у 60% плодов с болезнью Дауна и 0,6% плодов с нормальным кариотипом (Otano L. et al., 2002). Отсутствие визуализации носовых костей у плодов с нормальным кариотипом встречается очень редко.

Таким образом, *по сравнению с другими известными маркерами хромосомной патологии плода, данный ультразвуковой маркер позволяет значительно снизить частоту ложноположительных результатов и, следовательно, необходимость в проведении инвазивной пренатальной диагностики.* Однако для оценки эффективности данного маркера в комбинации с другими маркерами хромосомной патологии плода необходимо проведение проспективных исследований.

Согласно данным, полученным в нашей лаборатории, отсутствие визуализации носовых костей отмечалось у 13% плодов с хромосомной патологией, 11,1% плодов с болезнью Дауна, при частоте ложноположительных результатов 0,09% (1 из 1026). Чувствительность и специфичность данного скринирующего теста составили 13 и 99,9% соответственно. Прогностическое значение положительного и отрицательного результатов – 75 и 98% соответственно.

Обращает на себя внимание, что по сравнению с данными других авторов в нашем исследовании отмечалось крайне небольшое число плодов с хромосомной патологией, у которых носовые кости при ультразвуковом исследовании не визуализировались. Морфологическое исследование плодов с отсутствием визуализации носовых костей, проведенное под руководством S.Minderer и соавт. (2003), показало наличие центров оссификации носовых костей у 16 из 17 обследованных плодов с болезнью Дауна. Данная находка свидетельствует о том, что в большинстве случаев хромосомной патологии плода имеет место выраженная гипоплазия носовых костей, которая может ошибочно расцениваться как истинная агенезия носовых костей. Авторы выполнили повторную ретроспективную

оценку ультразвуковых изображений, и носовые кости были обнаружены у 5 из 6 плодов, но их длина была менее 5 перцентили, контуры нечеткие, а экзогенность снижена, что было расценено как проявление гипоплазии носовых костей.

В качестве дополнительного ультразвукового маркера хромосомных болезней некоторые исследователи предлагают использовать длину костей спинки носа плода в I триместре беременности (Медведев М.В., Алтынник Н.А., 2003). Однако пока нет единого мнения о преимуществах количественного измерения по сравнению с качественным определением наличия или отсутствия визуализации носовых костей (Minderer S. et al., 2003; Orlandi F. et al., 2003). Для расчета риска хромосомной патологии плода предложены процентильные таблицы длины носовых костей плода для каждой недели беременности (Sonek J.D. et al., 2003), полученные при обследовании 3537 плодов.

Риск наличия хромосомного заболевания у плода считается повышенным при длине носовых костей менее 5-й перцентили для данного срока беременности.

По некоторым данным (Viora E. et al., 2003), отсутствие визуализации носовых костей или их гипоплазия наблюдались у 63% плодов с различными хромосомными заболеваниями, в частности, у 80% (8 из 10) плодов с болезнью Дауна. У плодов с нормальным кариотипом длина носовых костей в 98,6% случаев находилась в пределах 5-й перцентили. Согласно другим наблюдениям, носовые кости не визуализируются примерно у 66,7% (10/15) плодов с болезнью Дауна и у 1% плодов с нормальным кариотипом (Orlandi F. et al., 2003). При этом у оставшихся 5 плодов с болезнью Дауна в этом исследовании длина носовых костей была менее 50 перцентили, и лишь у одного плода из 1027 обследованных длина носовых костей оказалась менее 1,5 мм. Было сделано заключение, что для решения вопроса о целесообразности измерения длины носовых костей в I триместре беременности необходимо проведение больших популяционных исследований. Таким образом, пока не существует единого мнения о том, имеет ли количественная оценка этого показателя какие-либо дополнительные преимущества по сравнению с качественной оценкой наличия или отсутствия носовых костей.

Согласно нашим данным (Некрасова Е.С., 2005) скрининг с учетом длины носовых костей позволяет выявить до 20%

плодов с хромосомной патологией (в том числе 22,2% плодов с болезнью Дауна) при частоте ложноположительных результатов 2,9%. Чувствительность и специфичность данной модели составили соответственно 19 и 97%, а прогностическая значимость положительного и отрицательного результатов — 13,8 и 97,9% соответственно.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при отсутствии визуализации носовых костей плода с большой степенью вероятности можно заподозрить наличие у него хромосомной патологии. Однако у большинства плодов с хромосомной патологией носовые кости визуализируются уже в I триместре беременности, что не позволяет использовать оценку носовых костей в качестве единственного маркера патологии плода. В этой связи более целесообразным представляется проводить измерение длины носовых костей в сочетании с другими маркерами хромосомной патологии плода в I триместре беременности.

Особый интерес представляет анализ прогностической значимости сочетанного учета ТВП и визуализации носовых костей при скрининге хромосомной патологии в I триместре беременности. В настоящее время по этому вопросу не существует единого мнения. Согласно обстоятельному исследованию Е.Виора и соавт., толщина воротникового пространства плода и отсутствие визуализации носовых костей или их гипоплазия являются независимыми показателями. Это позволяет использовать оба УЗ-маркера для увеличения эффективности ультразвукового скрининга хромосомной патологии плода (Vioga E. et al., 2003).

Вместе с тем, в других исследованиях установлено, что у плодов с увеличением ТВП чаще отмечается отсутствие визуализации носовых костей по сравнению с плодами, ТВП у которых находилась в пределах нормы (Zoppi M.A. et al., 2003). Так, из 7 плодов с нормальным кариотипом и отсутствием визуализации носовых костей, увеличение ТВП отмечалось в 6 случаях. Из 27 плодов с болезнью Дауна носовые кости не визуализировались в 19 случаях, при этом только у 2 из 19 плодов значение ТВП было менее 2,5 мм. Таким образом, для установления или исключения взаимосвязи между ТВП и наличием или отсутствием визуализации носовых костей также необходимо проведение дальнейших исследований. Отсутствие визуализации носовой кости у плодов с хромо-

сомной патологией можно объяснить задержкой оссификации костных структур.

При патоморфологическом исследовании лицевых структур плодов с болезнью Дауна, у которых при проведении ультразвукового исследования в 11–14 нед. носовые кости не визуализировались, было установлено, что у таких плодов количество остеоцитов не превышало 10–20% от всего клеточного состава костно-хрящевой ткани носа. У плодов с нормальным кариотипом и наличием носовых костей при УЗИ, проведенном в те же сроки, количество остеоцитов составляло 35–50% от всего клеточного состава костно-хрящевой ткани носа (Rustico M.A. et al., 2004). По мнению авторов, эти находки подтверждают, что агенезия или гипоплазия носовых костей у плодов с болезнью Дауна возникает вследствие задержки созревания центров оссификации носовых костей.

Изучение носовых костей у 21 плода с болезнью Дауна позволило установить, что при ультразвуковом исследовании в 12–13 нед. у 5 из них носовые кости не визуализировались, но при рентгенологическом исследовании абортусов через 1–10 нед. они уже определялись (Larsose P. et al., 2003). Это поддерживает гипотезу о задержке созревания центров оссификации носовых костей при болезни Дауна. Вместе с тем, у 4 плодов визуализация носовых костей при ультразвуковом исследовании в 12–13 нед. не подтвердилась через 2–12 нед. при рентгенологическом исследовании абортуса. Эти данные свидетельствуют о том, что визуализация и измерение носовых костей должны проводиться с соблюдением всех стандартных рекомендаций УЗ обследования (см. выше).

Существенная прогностическая ценность этого УЗ-маркера неоднократно подтверждалась и в работах других авторов. В частности, проведено ультразвуковое и патоморфологическое исследование 16 плодов с болезнью Дауна при сроках беременности 11–14 нед. При ультразвуковом исследовании у 6 плодов носовые кости не визуализировались, у 10 плодов отмечалась гипоплазия носовых костей. При гистологическом исследовании центры оссификации носовых костей были обнаружены у 16 из 17 плодов. При повторной ретроспективной оценке ультразвуковых изображений носовые кости были обнаружены у 5 из 6 плодов, но их контуры были нечеткие, а экзогенность снижена. Только у одного плода при гистологическом исследовании центры оссификации носовых костей

не определялись (Minderer S. et al., 2003). Эти результаты интерпретировали как крайнюю степень гипоплазии носовых костей. Авторы предложили оценивать носовые кости как «нормальные» или «гипоплазированные», однако не выделили четких критериев гипоплазии. Тем не менее, обнаружение центров оссификации носовых костей при гистологическом исследовании является важной патоморфологической находкой, свидетельствующей о прогностической ценности измерения носовых костей в I триместре беременности. Однако для выработки более четких критериев гипоплазии носовых костей требуется проведение серий ультразвуковых исследований, дополненных патоморфологическим анализом.

8.1.3. Другие УЗ-маркеры хромосомной патологии в I триместре беременности

В настоящее время продолжается активный поиск новых информативных маркеров, свидетельствующих о повышенном риске хромосомной патологии у плода.

Так, в последние годы получены сведения, что качественная оценка *характера кровотока в венозном протоке* может быть весомым дополнительным признаком при диагностике хромосомных заболеваний плода в конце I триместра беременности. По данным ряда исследований, хромосомная патология у плода в 80–90% случаев сочетается с появлением ретроградного кровотока в венозном протоке в фазу сокращения предсердий.

Многие исследователи отмечают, что реверсные (обратные току крови) значения кровотока в венозном протоке являются маркером хромосомной патологии плода лишь в определенные сроки беременности. Так, имеются данные, что патология кровотока в венозном протоке плодов с хромосомной патологией достоверно чаще встречается в 10–13 нед. (76,9%) по сравнению с 14–16 нед. беременности (42,2%) (Antolin E. et al., 2001).

При обследовании плодов с хромосомной патологией в 10–17 нед. беременности патологические кривые скоростей кровотока (КСК) в венозном протоке были зарегистрированы в 82% случаев у плодов с трисомией 18 и в 63% — с трисомией 21 (Bilardo C.M. et al., 2001). Сходные данные получены и в другой работе (Muller M.A. et al., 1999) — реверсные и нулевые значения кровотока в венозном протоке в фазу сокра-

щения предсердий зарегистрированы в 82% случаев трисомии 18 и в 68% – трисомии 21. Реверсные значения кровотока в венозном протоке в фазу сокращения предсердий были обнаружены в 11 нед. беременности и у плода с мозаичной формой трисомии 8. Следует отметить, что в данном случае толщина воротникового пространства плода была в пределах нормы. Учитывая аномальный кариотип, беременность прервали в 15 нед. (Campbell S. et al., 2001). При патологоанатомическом исследовании отмечено отсутствие клапана овального окна, что, по мнению авторов, явилось причиной аномального спектра кровотока в венозном протоке и могло быть причиной дефекта межпредсердной перегородки в постнатальном периоде.

Таким образом, *аномальное направление кровотока в венозном протоке плода является еще одним УЗ-маркером хромосомной патологии*. Патогенетическую основу этих нарушений могут составить аномалии сердца, также нередко выступающие в качестве УЗМ хромосомных болезней. Действительно, хромосомная патология у плода часто сочетается с врожденными пороками сердца. Патологоанатомические исследования 36 плодов с трисомией 21 позволили выявить аномалии сердца у 27 из них. При этом сравнительно частым нарушением был дефект межжелудочковой перегородки, который, по мнению авторов, играет важную роль в патогенезе увеличения ТВП, особенно при ее величине более 4 мм (Nyett J.A. et al., 1997). При морфометрических исследованиях крупных сосудов у 34 плодов с трисомией 21 были выявлены меньший диаметр перешейка аорты в сочетании с более широким аортальным клапаном и восходящим участком дуги аорты по сравнению с таковыми у плодов с нормальным кариотипом. В связи с тем, что объемный кровоток зависит от диаметра сосудов, расширение восходящего участка дуги аорты и одновременное сужение ее перешейка могут привести к усилению кровотока в верхней половине туловища плода. Однако формирование отека в данной области возможно только в случае нарушения венозного оттока крови на фоне сердечной недостаточности у плода. Подобные изменения гемодинамики могут привести к увеличению толщины воротникового пространства и регистрации нетипичного спектра кровотока в венозном протоке у плодов с трисомией 21. Существует достаточно обоснованное мнение, что комбинация таких находок,

как увеличение ТВП и реверсные значения кровотока в венозном протоке в фазу сокращения предсердий увеличивает риск хромосомной патологии плода в 7–12 раз.

Использование значений КСК в венозном протоке в качестве показания к инвазивной пренатальной диагностике у беременных высокого риска рождения детей с хромосомной патологией, позволяет уменьшить общую частоту необходимых инвазивных процедур с 5 до 0,5% (Matias A. et al., 1998).

Нулевой или реверсный поток крови в венозном протоке в фазу сокращения предсердий встречается также и при нормальном кариотипе, что, по мнению большинства исследователей, следует в первую очередь связывать с врожденными пороками сердца (ВПС). Так, у 54% плодов с нормальным кариотипом и патологическими КСК в венозном протоке при ультразвуковом исследовании в 14–16 нед. были диагностированы тяжелые ВПС (Matias A. et al., 1998).

В исследовании группы Билардо (Bilardo С.М. et al., 2001) комбинация расширенного воротникового пространства и аномального спектра кровотока в венозном протоке позволила диагностировать 26,8% ВПС уже в начале II триместра беременности. Авторы не согласны с тем, что анализ КСК в венозном протоке в ранние сроки беременности позволит снизить число инвазивных процедур, выполняемых с целью исключения хромосомной патологии. Они предлагают при решении вопроса о кариотипировании плода ориентироваться только на ТВП. Затем, после исключения хромосомной болезни, проводить исследование кровотока в венозном протоке для исключения ВПС.

При обследовании 200 плодов с расширенным воротниковым пространством в 10–14 нед. беременности в 7 из 11 случаев (63,6%) нулевых или реверсных значений кровотока в венозном протоке в фазу сокращения предсердий обнаружили наличие ВПС. Во всех наблюдениях отмечены неблагоприятные перинатальные исходы (Matias A. et al., 1999).

Таким образом, ультразвуковое исследование в I триместре беременности является достаточно информативным методом диагностики врожденных пороков развития и хромосомной патологии плода. Исследование кровотока в венозном протоке в конце I триместра беременности свидетельствует о наличии сердечной декомпенсации у плода и может служить

дополнительным ультразвуковым маркером аномального кариотипа.

Следует отметить, что многие исследователи отмечают проходящий характер реверсного кровотока в венозном протоке плода при хромосомной патологии или ВПС. Нормализация аномального спектра кровотока в венозном протоке может происходить сразу после 14 нед. беременности. Следовательно, **доплерометрия кровотока в венозном протоке должна выполняться в строго регламентированные сроки, что позволит избежать ложноотрицательных результатов и повысить частоту выявления хромосомной патологии и ВПС.** К сожалению, патофизиологическая основа данного феномена остается неизученной.

Таким образом, представленные данные однозначно свидетельствуют о том, что **изучение КСК в венозном протоке имеет важное диагностическое значение при хромосомной патологии и пороках развития сердца у плода. Этот тест заслуживает широкого внедрения в центрах пренатальной диагностики, особенно при выявлении увеличенного воротникового пространства плода.** Вопрос об отборе пациенток группы высокого риска по хромосомной патологии и ВПС на основании аномального кровотока в венозном протоке и расширенного воротникового пространства в ранние сроки беременности требует всестороннего изучения большого фактического материала. Вместе с тем, до сих пор нет данных о безопасности и целесообразности применения доплеровского исследования в I триместре беременности.

Поиск новых ультразвуковых маркеров хромосомной патологии плода в I триместре беременности активно продолжается. В частности, с этой целью уже предлагается оценивать длину ушных раковин плода (Chitkara U. et al., 2002), диаметр и число петель пуповины (Raio L. et al., 2004), длину верхней челюсти (Cicero S. et al., 2004), длину плечевой кости (Longo D. et al., 2004), объем плаценты (Metzenbauer M. et al., 2002). Однако пока эти маркеры не нашли отражения в протоколе скринингового ультразвукового исследования, и их оценка проводится только в исследовательских целях.

Частой находкой при хромосомной патологии является синдром задержки развития плода (СЗРП), который устанавливается при оценке фетометрических параметров (копчиково-тазовой размер и размеры трубчатых костей). Отставание фе-

тометрических параметров от нормы для данного срока беременности может свидетельствовать о нарушении развития плода. Однако оценка состояния костной системы плода в I триместре беременности вызывает трудности, так как при проведении первого ультразвукового исследования не всегда известен точный срок беременности, что требует проведения повторного ультразвукового исследования и оценки темпов роста плода. В связи с этим, диагностика СЗРП более характерна для II триместра беременности.

8.2. СКРИНИНГОВЫЕ УЛЬТРАЗВУКОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В 18–22 НЕДЕЛИ БЕРЕМЕННОСТИ

При втором скрининговом исследовании (18–22 нед.) проводится детальная оценка анатомических структур плода для обнаружения у него пороков развития, маркеров хромосомной патологии, ранних форм задержки развития плода, патологии плаценты и пуповины, аномального количества околоплодных вод. При наличии отклонений в этих характеристиках беременная направляется на 2-й уровень УЗИ, при котором происходит изучение плода на УЗ-аппаратах высокого разрешения не только для диагностики анатомических пороков, но и с целью выявления стойких функциональных нарушений. Основное внимание обращается на аномалии мозга, сердца, плаценты. Разработаны и широко используются стандартные протоколы УЗ исследования плода во II триместре беременности (Приказ №457 МЗ РФ от 28.12.2000). Помимо обычного ультразвукового сканирования для выявления пороков этих органов, высоко информативным является применение *доплерометрии и цветного доплеровского картирования*.

Во II триместре выявляется подавляющее большинство пороков развития. Так, эффективность диагностики гастрошизиса составляет 95%, расщелин лица – 77,3%, агенезии почек – 73%, пороков развития легких – 64%. Наибольшие трудности составляет диагностика пороков развития сердца и атрезии пищевода: 39,3 и 40% соответственно. Подробнее об эхографической картине при том или ином пороке развития плода можно прочесть в специализированных руководствах (Юдина Е.В., Медведев М.В., 2002; Снайдерс Р.Дж.М., Николаидес К.Х., 1997).

Важное значение для решения вопроса о кариотипировании плода и выработке рекомендаций по тактике ведения беремен-

ности имеют выявляемые во II триместре маркеры хромосомной патологии, такие как аномальная форма головки плода, дефекты лица и шеи, вентрикуломегалия, кисты сосудистых сплетений головного мозга, гиперэхогенные включения в желудочках сердца, гиперэхогенный кишечник, пиелозктазия, укорочение трубчатых костей, задержка внутриутробного развития плода, генерализованный отек плода, единственная артерия пуповины.

Фенотипические проявления хромосомных aberrаций во II триместре беременности значительно более многообразны по сравнению с первым. Пороки развития, выявляемые с помощью УЗИ, встречаются у большинства плодов с хромосомным дисбалансом. Частота хромосомных нарушений у плодов с пороками развития, выявленными при УЗИ, по обобщенным данным Р.Дж.М.Снайдерс и К.Х.Николаидеса (1997) суммированы в таблице 8.1. Хромосомная патология особенно типична для плодов с множественными пороками развития. Так, согласно обобщенным данным мировой литературы (Снайдерс Р.Дж.М., Николаидес К.Х., 1997), частота хромосомных нарушений у плодов с изолированными пороками развития, такими как вентрикуломегалия, голопроэнцефалия, расщелины лица, врожденные пороки сердца и многие другие, возрастает в среднем в 5–10 раз при их сочетании с другими УЗ-маркерами. Так, если при наличии одного УЗ-маркера хромосомные aberrации встречаются только у 2% плодов, то при наличии 2 – уже у 11%. При обнаружении более 3–5 маркеров вероятность выявления плодов с хромосомными нарушениями увеличивается до 50%.

Характерным маркером хромосомных болезней является количество околоплодных вод. Нередко маловодие может быть единственным маркером, поскольку отсутствие околоплодных вод существенно затрудняет исследование органов и систем плода. Одним из частых дополнительных маркеров хромосомных болезней является аплазия или гипоплазия артерии пуповины. В отдельных случаях отмечаются нарушения плаценты (утолщение и отек плаценты, наличие кист плаценты, плацента в виде «швейцарского сыра»).

Наличие грубых, не совместимых с жизнью анатомических пороков, выявленных при ультразвуковом скрининге как в I, так и во II триместрах беременности, является достаточным основанием для рекомендации о прерывании данной бе-

Таблица 8.1

Частота хромосомных нарушений у плодов с пороками развития, выявленными при УЗИ (по Р.Дж.М.Снайдерс, К.Х.Николаидес, 1997)

| Аномалия развития | Число наблюдений | Изолированный порок, % | В сочетании с другими признаками, % |
|-----------------------------------|------------------|------------------------|-------------------------------------|
| Вентрикуломегалия | 690 | 2 | 17 |
| Голопрозэнцефалия | 94 | 4 | 39 |
| Кисты сосудистого сплетения | 1884 | 1 | 48 |
| Киста задней черепной ямки | 101 | 0 | 52 |
| Расщелина лица | 118 | 0 | 51 |
| Микрогнатия | 65 | — | 62 |
| Кистозная гигрома | 312 | 52 | 71 |
| Избыточная шейная складка | 371 | 19 | 45 |
| Диафрагмальная грыжа | 173 | 2 | 49 |
| Врожденные пороки сердца | 829 | 16 | 66 |
| Атрезия двенадцатиперстной кишки | 44 | 38 | 64 |
| Гиперэхогенный кишечник | 196 | 7 | 42 |
| Омфалоцеле | 495 | 8 | 46 |
| Пороки мочевыделительной системы | 1780 | 3 | 24 |
| Аномальная установка стоп | 127 | 0 | 33 |
| Задержка внутриутробного развития | 621 | 4 | 38 |

ременности. Вместе с тем, важно еще раз подчеркнуть, что ультразвуковой скрининг только констатирует факт наличия нарушений, но не вскрывает его причину. Соответственно и тактика ведения беременности будет определяться не только тяжестью выявленного порока, но и тем, имеет он экзогенную или эндогенную (наследственную) этиологию. Для исключения последней, по крайней мере, на уровне хромосомного дисбаланса, ультразвуковое сканирование должно быть дополнено анализом кариотипа плода. Это особенно важно для выбора правильной тактики ведения беременности и способа родоразрешения, а также выбора оптимального метода лечения новорожденного в случаях наличия пороков, кото-

рые совместимы с жизнью и могут быть успешно скорректированы после рождения с хорошим медико-социальным прогнозом в отношении дальнейшего развития ребенка. *При наличии не совместимых с жизнью пороков развития плода перед прерыванием беременности необходимо обязательно провести кариотипирование плода, так как наличие хромосомной патологии является показанием для пренатального кариотипирования при всех последующих беременностях у данной супружеской пары.* Таким образом, показанием для направления беременной на инвазивную пренатальную диагностику для исключения хромосомной патологии плода является выявление на втором уровне ультразвукового исследования пороков развития плода двух и более маркеров хромосомной патологии. *До 19 нед. 3 дней выполняется биопсия плаценты, при сроке беременности, превышающем 19/20 нед., проводится взятие крови из вены пуповины плода (кордоцентез).* Более подробно с техникой и условиями проведения инвазивных вмешательств с целью получения плодного материала можно ознакомиться в главе IX.

8.3. СКРИНИНГОВОЕ УЛЬТРАЗВУКОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ В 32–34 НЕДЕЛИ БЕРЕМЕННОСТИ

При скрининговом ультразвуковом исследовании в III триместре (32–34 нед.) проводится оценка темпов роста плода и выявление ряда пороков с поздней манифестацией. УЗИ на этих сроках позволяет уточнить состояние систем жизнеобеспечения (сердце, плацента, пуповина, количество околоплодных вод) для решения вопроса о возможной оперативной коррекции некоторых пороков, для выработки стратегии и тактики родоразрешения. *Выявление пороков при УЗ-скрининге в III триместре считается запоздалым и требует проведения лечебно-контрольной комиссии, так как указывает на дефекты организации службы ПД.*

При выявлении пороков развития плода в эти сроки перед врачом и беременной женщиной возникают медицинские и морально-этические проблемы. Эти проблемы связаны с решением судьбы жизнеспособного плода с наследственной или врожденной патологией. Что касается методической части, то любые инвазивные вмешательства, технически выполнимые во II триместре, вполне применимы и в III триместре беременности. Однако единственной весомой причиной для

проведения инвазивного вмешательства с целью ПД в III триместре является необходимость выработки дальнейшей тактики ведения беременности и, главное — способа родоразрешения с учетом состояния матери и диагноза у плода.

Следует отметить, что ни сроки беременности, ни характер инвазивных манипуляций во II и III триместрах не регламентированы нормативными документами по пренатальной диагностике. При этом, согласно Приказу МЗ РФ №302 от 28.12.93, искусственное прерывание беременности при наличии врожденных пороков развития и наследственных заболеваний возможно на любом сроке. Однако *проведение ПД и прерывание беременности в III триместре нельзя оправдать наличием такого приказа. Их следует рассматривать как безусловный дефект в организации и состоянии всей службы ПД врожденных и наследственных болезней.*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ультразвуковое исследование (УЗИ) плода является основным прямым неинвазивным методом ПД. Согласно рекомендациям Европейской ассоциации по перинатальной медицине, поддержанными Минздравом РФ в Приказе по организации службы пренатальной диагностики №457 от 28.12.2000, каждой беременной рекомендуется трехкратное УЗ обследование плода на 10–14-й, 18–22-й и 30–32-й неделях беременности. Критически рассмотрены основные маркеры хромосомной патологии в I триместре, такие как толщина воротникового пространства (ТВП), отсутствие визуализации носовых костей (ОВНК), пороки сердца, патологический характер кровотока в венозном протоке, синдром задержки развития плода (СЗРП). Во II триместре беременности выявляется подавляющее большинство пороков развития, наличие которых резко увеличивает вероятность хромосомной патологии у плода. Перед прерыванием беременности при наличии пороков, не совместимых с жизнью, целесообразно карiotипирование плода для выработки оптимальных рекомендаций при последующей беременности. Инвазивная ПД в III триместре проводится только для выработки тактики ведения беременности и выбора оптимального способа родоразрешения.

ГЛАВА IX. ИНВАЗИВНЫЕ МЕТОДЫ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Инвазивные методы (ИМ) пренатальной диагностики (ПД) включают хорионбиопсию в I триместре беременности, плацентобиопсию, амниоцентез и кордоцентез во II и III триместрах, реже – биопсию кожи, печени и других органов плода. ИМ ПД относятся к верифицирующим методам, так как позволяют получить материал плода, необходимый для точной диагностики врожденной или наследственной патологии с помощью специальных лабораторных методов исследования и определения оптимальной тактики ведения беременности. *Основной задачей инвазивных внутриматочных вмешательств является обеспечение безопасного для матери и плода получения на разных сроках беременности образцов тканей провизорных органов (хорион, плацента, амнион) или самого плода (кровь из пуповины), пригодных для последующего анализа с помощью различных специальных методов исследования* (Evans M.I. et al., 1996). В настоящее время эта задача успешно решена. Разработаны эффективные специальные методы лабораторной диагностики многих, в том числе наиболее частых, социально значимых врожденных и наследственных заболеваний (ВНЗ) человека. В полном объеме ПД в России проводится лишь в отдельных федеральных медико-генетических центрах – ФМГЦ (Баранов В.С. и др., 2002; Бахарев В.А., 2004). К их числу относится и ФМГЦ Санкт-Петербурга, созданный в 1991 г. на базе лаборатории ПД наследственных и врожденных заболеваний НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН. В настоящей главе обобщен многолетний опыт работы этого центра в области ИМ ПД.

9.1. БИОПСИЯ ВОРСИН ХОРИОНА/ПЛАЦЕНТЫ

Являясь производными одной клетки – зиготы, ткани эмбриобласта и трофобласта несут одинаковую генетическую

информацию (см. главу II). Это определяет возможность ПД наследственных заболеваний плода путем исследования ворсин хориона. Клетки трофобласта имеют высокую митотическую активность, что позволяет использовать их для карiotипирования. Цитогенетическое исследование ворсин хориона может быть проведено и после их предварительного кратковременного или продолжительного культивирования (см. главу X). Ворсины хориона широко используются и для диагностики моногенных заболеваний (см. главу XI).

Исследование ворсин хориона в I триместре беременности имеет важное преимущество перед другими инвазивными методами. Оно позволяет получить быстрый ответ и, при необходимости, прервать беременность уже на ранних сроках с наименьшим риском для здоровья женщины.

Впервые о возможности получения биоптата хориона было сообщено в 1968 г. при проведении пункции через свод стенки матки эндоскопом, оснащенный биопсийными щипцами (Mohr J., 1968). В дальнейшем был предложен трансцервикальный эндоскопический метод, который первоначально был опробован перед проведением искусственного аборта (Hahnemann N., Mohr J., 1968; Kullander S., Sandahl B., 1973). Место локализации хориона определяли под контролем эндоскопа, создавали разрежение в тубусе и иссекали хориальную ткань цилиндрическим скальпелем. При использовании этой техники биоптат содержал ворсины хориона только в половине случаев. Кроме того, отмечались значительные трудности в культивировании клеток хориона — число успешных попыток составляло всего около 30%. Существенные технические проблемы возникали при трансцервикальном способе получения хорионбиоптатов и в связи с необходимостью механического расширения цервикального канала у нерожавших женщин при введении эндоскопа диаметром 7 мм. В 75% случаев визуализация хориона была существенно затруднена. Попытки получения ворсин хориона с помощью трансцервикальной хорионбиопсии зачастую осложнялись внутриматочной инфекцией, перфорацией плодного пузыря и излитием околоплодной жидкости. Так, в 70-х годах прошлого века каждая 3—5-я попытка забора плодного материала в I триместре завершалась прерыванием беременности, что привело к временному запрету на проведение этой операции в СССР (Бочков Н.П., 1984).

Сообщение о возможности проведения трансцервикальной аспирации клеток хориона через металлический катетер с целью цитогенетического определения пола плода по половому хроматину (Anshan, 1975) стимулировало использование этого метода и для ПД хромосомных болезней (Goldberg M.F., 1980). К сожалению, в связи с высокой частотой осложнений и выраженной контаминацией биоптата материнскими клетками был сделан вывод, что «пренатальная диагностика в I триместре в настоящее время невозможна».

Таким образом, высокая частота осложнений и технические ограничения не позволили в то время внедрить эти методы в целях ПД.

Повторный интерес к ПД в I триместре возник в начале 1980-х годов. Он был связан с появлением возможности достаточно точной визуализации места локализации хориона в полости матки при ультразвуковом сканировании. В 1978 г. В.А.Бахаревым и сотрудниками впервые была осуществлена трансцервикальная щипцовая биопсия ткани хориона (Казы З., 1979; Розовский В.С. и др., 1980; Kazy Z. et al., 1982). В настоящее время этот метод, насколько нам известно, успешно применяется только в лаборатории автора.

Внедрение трансцервикальной аспирационной биопсии ворсин хориона под ультразвуковым контролем (Ward R.H.T. et al., 1983), разработка специального катетера (Simoni G. et al., 1983) привели к значительному повышению эффективности биопсии и снижению количества осложнений. Это способствовало широкому внедрению данного метода во многих перинатальных центрах в 1990-х годах (Brambati B., Oldrini A., 1986).

Наиболее удачной методической модификацией биопсии ворсин хориона в I триместре беременности явилось появление и усовершенствование трансабдоминальной аспирационной биопсии (Brambati B., Oldrini A., 1986).

В настоящее время этот метод стал основным в ПД I триместра беременности (Holzgreve W., Miny P., 1996; Lyndon M.H., 1997).

Разработаны и широко применяются два варианта трансабдоминальной хорионбиопсии. *Одноигольная методика* выполняется в НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН (на рисунке 9.1 представлены последовательные этапы операции) с помощью иглы с мандреном для спинномозговой пункции диаметром

18G длиной 150–200 мм («Medioplast», Швеция; «Inter.V», США). При ее выполнении используются датчики, оснащенные пункционными адаптерами. Траектория движения выбирается с помощью пункционной трассы на экране монитора УЗ сканера таким образом, чтобы игла проходила через ткань хориона параллельно хориальной оболочке. Необходимо тщательно следить, чтобы в начале пункции не повредить петлю кишечника или стенку мочевого пузыря. Игла должна погрузиться в ткань хориона на максимально возможную глубину, оставаясь при этом параллельной хориальной оболочке, чтобы избежать ее случайного повреждения. Убедившись в правильном расположении иглы, из нее извлекают мандрен и присоединяют шприц с 5 мл питательной среды, закрепленный в специальном держателе (холдере) (рис. 9.1). Постоянно производя аспирацию, в толще хориона выполняют несколько возвратно-поступательных движений. Извлечение иглы также сопровождается процессом аспирации. «Вакуумная» техника хорионбиопсии необходима для получения такого количества материала, которое достаточно для лабораторных, прежде всего, цитогенетических исследований.

Успешность аспирации ворсин хориона, т.е. количество ворсин, достаточное для последующей лабораторной диагностики, определяют врачи-лаборанты-цитогенетики, присутствующие при манипуляции. Они исследуют содержимое шприца визуально в проходящем свете и под контролем бинокулярной лупы в чашках Петри с питательной средой отбирают ворсинки хориона. Количество аспирированных ворсин оценивают с помощью стандартных таблиц. Для стабильного проведения цитогенетических исследований требуется не менее 5 мг ворсин, а для молекулярно-генетического исследования может быть достаточно около 1 мг.

Вторая модификация трансабдоминальной хорионбиопсии, так называемая *двухигольная методика*, в настоящее время менее распространена и применяется только в некоторых зарубежных перинатальных центрах. При ее выполнении используется две иглы: проводниковая (наружная) — тонкостенная игла 18G или иглы для спинномозговой пункции диаметром 16G длиной 100–150 мм и биопсийная (внутренняя) игла диаметром 20G длиной 150–200 мм. Игла большего диаметра используется как троакар, который вводится в миометрий, а более тонкая и длинная погружается непосредственно в толщу

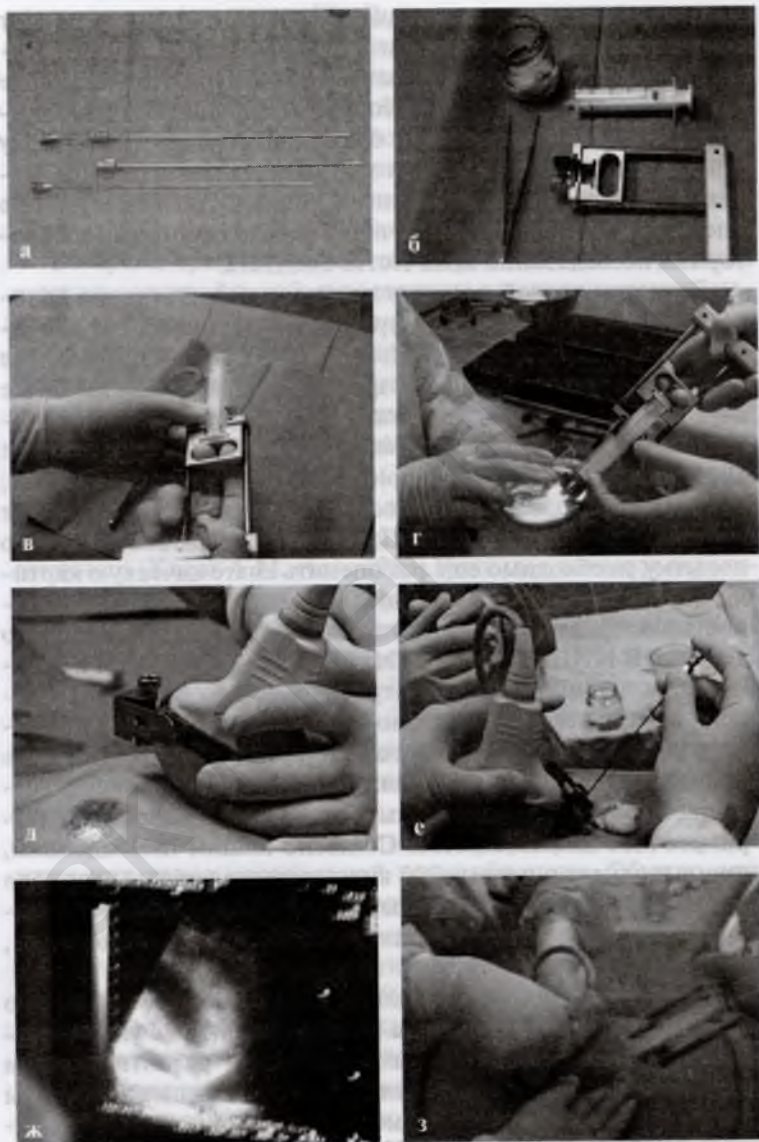


Рис. 9.1. Последовательные этапы выполнения трансабдоминальной хорионбиопсии (плацентобиопсии).

хориона. Затем из нее извлекают мандрен и присоединяют шприц с питательной средой. В дальнейшем аспирация осуществляется вышеописанным способом. При этом варианте существует возможность повторной аспирации без дополнительного прокола передней брюшной стенки. По нашему опыту, одноигольная техника занимает меньше времени, менее дискомфортна для пациентки и при достаточном навыке оператора обеспечивает получение необходимого для лабораторных исследований количества биоптата.

Если при первой попытке получено недостаточное количество материала, то процедуру можно повторить без дополнительного риска (Boehm F.H. et al., 1993). Угроза прерывания беременности достоверно возрастает при проведении более двух попыток и может достигать 10%, если выполняется третья попытка (Jackson L.G., Wapner R.J., 1987; Rhoads G.G. et al., 1989). Она должна предприниматься только в том случае, если имеется полная уверенность в необходимости получения нужного объема материала. Прежде чем решиться на третью попытку, необходимо еще раз оценить анатомическую картину, добиться полной релаксации миометрия и найти возможность альтернативного предыдущим попыткам оперативного доступа. В НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН, так же как и в большинстве перинатальных центров, трансабдоминальная биопсия ворсин хориона успешно выполняется с первой попытки в 96–99% случаев. В настоящее время ее эффективность приближается к 100%. Эффективность хорионбиопсии возрастает пропорционально опыту врача, выполняющего внутриматочное вмешательство. Согласно нашим наблюдениям, при выполнении первых 200 вмешательств ворсины хориона были получены с первой попытки в 80% случаев, в последующем этот показатель возрастал до 96–99% (Михайлов А.В., 1999).

В начале 90-х годов появились единичные сообщения, что хорионбиопсия в I триместре может сочетаться с увеличением частоты изолированных аномалий развития плода (Firth H.V. et al., 1991a, b). Было описано повышение частоты поперечных редукций конечностей и оромандибулярных гипогенезий (Dolk H. et al., 1992). Отмечено увеличение частоты подобных нарушений после хорионбиопсий, выполненных в период с 8-й по 9-ю недели беременности. Известно, что формирование конечностей завершается к 56-му дню раз-

вития плода (см. главу II). Высказано предположение, что возможной причиной пороков развития конечностей у плодов, перенесших хорионбиопсию до 9,5 нед. беременности, могли быть нарушения кровообращения у плода после оперативного вмешательства. В настоящее время считается, что риск развития аномалий конечностей практически отсутствует, если инвазия проводится после 10-й недели беременности (Froster U.G., Jackson L., 1996).

Во время трансцервикальной хорионбиопсии неизбежен контакт с микрофлорой, и вследствие нарушения цервикального барьера при прохождении катетера существует возможность инфицирования полости матки и последующего развития хориоамнионита. В многочисленных исследованиях, однако, показано отсутствие связи между влагалищной микрофлорой, ее высевом с аспирационным катетером и осложнениями беременности (Froster U.G., Jackson L., 1996). Риск развития хориоамнионита после трансцервикальной хорионбиопсии составляет 0,1–0,3% и не отличается от среднепопуляционного (Kuliev A.M. et al., 1993). Учитывая высокую вероятность обсемененности микрофлорой аспирационного катетера после его удаления из цервикального канала, при необходимости повторной попытки аспирации следует использовать новый одноразовый катетер. В случае трансабдоминальной хорионбиопсии применение одноразовых игл практически полностью исключает возможность инфицирования хориона, однако при повторной пункции рекомендуется использование новой иглы.

Нарушения целостности плодного пузыря чаще встречаются при трансцервикальной хорионбиопсии. Обычно они сопровождаются видимым подтеканием околоплодной жидкости. Однако при достаточном опыте врача акушера-гинеколога нарушение целостности плодного пузыря отмечается очень редко, менее чем в 0,3% случаев, а при трансабдоминальной хорионбиопсии практически не встречается. Появление кровянистых выделений из половых путей — не редкое явление при трансцервикальной хорионбиопсии. Оно встречается почти у 30% пациенток, однако серьезные кровотечения с образованием ретрохориальных гематом бывают редко (Brambati V. et al., 1987). При трансабдоминальном доступе кровотечения из половых путей после операции отмечаются в единичных случаях.

Известно, что серьезную проблему для кариотипирования плода по клеткам хориона представляет хромосомный мозаицизм (см. главу X). Одним из источников мозаицизма могут быть клетки материнских тканей (эндометрия), отсасываемые шприцом вместе с ворсинками хориона. При строгом соблюдении методики биопсии возможность аспирации и попадания клеток материнского происхождения в препараты составляет 0,1–1,3%. Она более вероятна при использовании трансцервикального метода.

Учитывая повышение риска Rh-изоиммунизации при повреждении плацентарного барьера во время хорионбиопсии, женщинам с отрицательной резус-принадлежностью крови в профилактических целях после вмешательства показано введение антирезусного гамма-глобулина (Nicolaidis K.H. et al., 1996). В случае необходимости ПД у изоиммунизированных беременных женщин целесообразно отдавать предпочтение менее травматичному кордоцентезу. В НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН разработан и широко применяется специальный алгоритм ПД (Баранов В.С. и др., 2004) у беременных с Rh(-) принадлежностью крови (табл. 9.1).

Группа риска для пренатального кариотипирования во II триместре беременности формируется в значительной мере в результате биохимического и УЗ-скринингов. С целью получения клеток плода на этом сроке обычно используют амниоцентез (см. ниже). В настоящее время это самый распространенный вариант инвазивного вмешательства, который широко применяется в зарубежных перинатальных центрах для диагностики хромосомных болезней у плода. Этот метод, однако, не свободен от ряда существенных ограничений. Во-первых, это касается длительного (около 2 нед.) культивирования амниоцитов; в случае подтверждения диагноза это может повлечь за собой необходимость позднего прерывания беременности (Cartera J.M., Di Renzo, 1993). Во-вторых, необходимость длительного ожидания ответа может стать причиной психо-эмоциональных расстройств у беременной (Statham H., Green J., 1993).

Применение ускоренного прямого метода приготовления хромосомных препаратов из биоптатов ворсин хориона (глава X) позволяет с успехом использовать метод трансабдоминальной биопсии как в I, так и во II триместрах беременности. Методика и практические аспекты применения плацентобиопсии практически идентичны таковым при хорионбиопсии.

Таблица 9.1

Алгоритм проведения инвазивной пренатальной диагностики нарушений развития плода у беременных с Rh(-) принадлежностью крови в НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН

Инвазивная диагностика:

1. При первой беременности у пациентки с Rh(-) принадлежностью крови и Rh(+) принадлежностью крови у мужа возможна на любом сроке беременности с обязательной рекомендацией о проведении Rh-типирования плода и при необходимости введения 1 дозы анти-Д-иммуноглобулина в течение 48–72 ч после операции.
2. При повторной беременности у пациентки с Rh(-) принадлежностью крови и Rh(+) принадлежностью крови у мужа и отсутствием Rh-At – на любом сроке беременности с обязательной рекомендацией о проведении Rh-типирования плода и введении 1 дозы анти-Д-иммуноглобулина в течение 48–72 ч после операции.
3. При повторной беременности у пациентки с Rh(-) принадлежностью крови и Rh(+) принадлежностью крови у мужа и наличием Rh-At, а также в случае отягощенного «гемолитического» анамнеза – целесообразна при сроке беременности 19–20 нед. и более (амнио- и кордоцентез) с обязательным информированием беременной о высоком риске усиления иммунизации при неизбежном повреждении плацентарного барьера. В случае наличия абсолютных показаний и/или настойчивого желания пациентки выполнить инвазивную пренатальную диагностику на более ранних сроках беременности (хорион- и плацентобиопсия), несмотря на высокий риск усиления иммунизации, в историю болезни вносится соответствующая запись, заверенная подписью пациентки.
4. Пациентки с Rh(-) принадлежностью крови и наличием Rh(+) принадлежностью крови у плода после исключения нарушений развития плода по данным пренатальной диагностики для дальнейшего наблюдения и обследования направляются на специализированный прием сотрудников лаборатории патофизиологии плода с кабинетом УЗД НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН.

9.2. АМНИОЦЕНТЕЗ

Амниоцентез (АЦ) – пункция амниотической полости с целью извлечения околоплодной жидкости с находящимися в ней клетками – амниоцитами – для последующих лабораторных исследований или введения в амниотическую полость лекарственных средств при лечении ряда осложнений течения беременности. Это вмешательство может быть выполнено как в I триместре (так называемый ранний амниоцентез), так и во II и III триместрах беременности.

АЦ является первым инвазивным вмешательством, примененным во время беременности. В конце XIX в. его стали использовать для эвакуации амниотической жидкости из полости матки при беременности, осложненной развитием вы-

раженного многоводия (Prochownik L., 1877; Lamb D., 1881). Непосредственно для ПД АЦ был впервые применен в начале 1950-х годов. Сначала D. Bevis (1953) выявил связь между содержанием билирубина в околоплодной жидкости и тяжестью гемолитической болезни у новорожденных. Затем A. W. Liley (1961) предложил проведение серийных АЦ для определения тактики ведения беременности, осложненной изосенсибилизацией матери по резус-фактору, на основании определения содержания уровня билирубина в АЖ при прогрессировании беременности.

В 1960-х годах анализ клеток АЖ, полученных при АЦ, позволил определять пол плода и таким образом проводить диагностику X-сцепленных заболеваний (Riis P., Fuchs, 1960; Seer D. M., Margolis E., 1964), а также различных метаболических нарушений у плода (Jeffcoat T. N. A. et al., 1991; Nadler H., 1968). Последующие исследования показали возможность выделения из АЖ жизнеспособных клеток плодного происхождения, их культивирования и кариотипирования (Jacobson C. B., Barter R. N., 1967; Steele M. W., Breg W. T., 1966). Эти находки предопределили широкое применение АЦ для ПД наследственных болезней.

Считается, что на ранних сроках беременности АЖ накапливается в амниотической полости за счет осмотического градиента между эмбрионом и амниотической полостью (Seed A. E., 1980). К 10-й неделе объем околоплодной жидкости составляет около 30 мл и увеличивается в среднем на 20 мл в неделю до 14 нед., и до 60 мл в неделю до 18 нед. беременности. Мочепродукция плода — основной источник околоплодной жидкости во II и III триместрах. При доношенной беременности объем мочепродукции плода составляет 500–600 мл в день (Brace R. A., 1988).

Клетки АЖ — амниоциты — это клетки различных тканей плода (легкие, кишечник, мочевого пузыря), амниотических оболочек и пуповины, которые различными путями попадают в околоплодную жидкость. Наибольший интерес для ПД представляют фибробластоподобные амниоциты, которые обладают наибольшей митотической активностью. Около 20% амниоцитов сохраняют жизнеспособность при культивировании в специальных средах.

Длительность культивирования амниоцитов составляет, в среднем, 12–14 дней, а результаты кариотипирования получа-

ют только через 2–3 нед. после амниоцентеза. В 0,5–1% случаев исследование культуры клеток не позволяет провести карiotипирование плода, что может быть связано с отсутствием роста амниоцитов или контаминацией культуры клетками материнского происхождения (см. главу X). Необходимо отметить, что в последние годы в зарубежных центрах ПД особенно широко используется новый метод молекулярной диагностики хромосомных болезней (метод QF-PCR), причем объектом исследования являются некультивированные клетки АЖ, получаемые с помощью АЦ (см. главу XV). Исследование ДНК амниоцитов при помощи молекулярно-генетических методов также позволяет проводить ПД многих моногенных заболеваний (см. главу XI).

Кроме амниоцитов в АЖ присутствует много биохимических продуктов метаболизма плода, определение которых также может быть использовано для ПД некоторых наследственных болезней (муковисцидоз, адреногенитальный синдром, дефекты зарощения невральной трубки, различные болезни «накопления») (Баранов В.С. и др., 2002; Бахарев В.А., 2004). Однако в связи с успехами в изучении генома человека биохимические исследования амниотической жидкости постепенно вытесняются молекулярно-генетическими методами диагностики наследственных болезней у плода (Баранов В.С. и др., 1997, 2004).

АЦ в период с 16-й до 20-й недели беременности является одной из составляющих алгоритма пренатального скрининга на наличие дефектов развития нервной трубки плода. При увеличении концентрации АФП в сыворотке крови матери более 2,5 МОМ определение концентрации АФП и наличия специфической изоформы ацетилхолинэстеразы в АЖ позволяет выявить до 98% случаев данной патологии у плода (UK collaborative study, 1979). Современные ультразвуковые диагностические технологии постепенно вытесняют из клинической практики этот метод выявления пороков развития нервной трубки (Nadel A.S., 1990). Вместе с тем, увеличение концентрации АФП в сыворотке крови беременной более 4 МоМ является серьезным указанием в пользу наличия пороков нервной трубки или других нарушений развития плода (см. главу VII).

Ультразвуковой мониторинг во время АЦ в корне изменил методику его выполнения и повысил до 100% эффективность

получения АЖ, а также значительно снизил частоту осложненной как со стороны матери, так и плода. АЦ с целью пренатального кариотипирования обычно выполняется с 15-й по 17-ю недели беременности. Извлекают 10–20 мл АЖ, что составляет около 10% ее общего объема (Ramsey P.A., Fisk N.M., 1996).

В последние годы с повышением разрешающей способности ультразвуковых приборов проведен ряд работ по исследованию клинической эффективности «раннего» амниоцентеза, выполняемого с 9-й по 14-ю неделю беременности (Баранов В.С. и др., 2002). Учитывая малый объем АЖ в этот период беременности, для повышения количества извлекаемых амниоцитов предложен метод амниофильтрации (Burne D.L., 1995). Анализ отдаленных результатов «раннего» АЦ показал увеличение риска прерываний беременности, числа преждевременных родов, и, что заслуживает особого внимания, повышение частоты нарушений анатомического и функционального развития легких плодов после такого вмешательства (Penso C.A., 1990).

Приведенные данные заставляют с определенной осторожностью относиться к применению «раннего» АЦ с целью ПД.

9.3. КОРДОЦЕНТЕЗ

Кордоцентез (КЦ) – внутриматочная пункция сосудов пуповины для получения крови плода с целью ее использования для ПД врожденных и наследственных заболеваний плода и оценки его функционального состояния.

Впервые исследование крови плода до его рождения было выполнено E.Saling в 1960 г. (Rote N.S., 1982). Пробы крови получали из кожных покровов головки плода после отхождения околоплодных вод в родах. Основной целью забора крови плода в родах была оценка состояния его кислотно-основного равновесия. В последующем этот метод стал общепризнанным и рекомендован при ведении родов у женщин в случае подозрения на развитие гипоксии плода.

Попытки получения крови плода во время беременности были предприняты еще в середине 70-х годов. Так, в 1974 г. появилось сообщение (Kan Y.W. et al., 1974) о возможности проведения ПД гемоглобинопатий путем исследования крови плода, извлеченной с помощью множественных пункций плацентарной ткани. Однако при такой методике практичес-

ки невозможно извлечь кровь плода без примеси материнской крови (Alter V. et al., 1976), что не позволяло использовать ее для ПД большинства наследственных заболеваний плода. При этом в связи с развитием плодовых кровотечений и возникновением маточной активности частота гибели плодов достигала 10%.

В дальнейшем для извлечения крови плода была предложена фетоскопия, позволяющая осуществлять оптическую визуализацию сосудов плода в полости матки. При фетоскопии проводилась пункция сосудов плодовой поверхности плаценты (Hobbins J.C., Mahoney M., 1974) или непосредственно сосудов пуповины (Rodeck C.H., Campbell S., 1978). Эти методики позволяли получать кровь плода без примесей околоплодной жидкости и/или крови матери, однако они имели существенные технические ограничения. Так, использование операционных фетоскопов связано со значительной травмой матки и, вследствие этого, с увеличением частоты прерываний беременности непосредственно после операции — до 5–8% (International fetoscopic group, 1984). Кроме того, данное вмешательство невозможно при расположении плаценты по передней стенке матки, при уменьшении количества амниотической жидкости, а также требует стационарных условий и применения анестезии.

Эти недостатки фетоскопии привели к ее полному забвению после появления альтернативной методики получения крови плода путем пункции вены пуповины под ультразвуковым контролем (Daffos F. et al., 1984). Существуют несколько технически различных вариантов забора крови плода с помощью КЦ. Исторически более ранней является трансабдоминальная трансплацентарная пункция сосудов пуповины в области ее «корня» методом свободной руки («free hand»). Методика заключается в пункции сосуда пуповины достаточно «толстыми» иглами — 18–20G, что является определенным недостатком, так как при этом увеличивается риск кровотечения из места пункции. Ее другим существенным недостатком является необходимость латеральных движений иглой при выборе оптимальной плоскости для выполнения пункции сосуда, что увеличивает травматичность вмешательства (Angel J.L., 1989; Soothill P.W., 1996).

В настоящее время техника КЦ существенно усовершенствована. Она выполняется под контролем ультразвукового

исследования в амбулаторных условиях, не требует премедикации и анестезии. Соблюдение правил асептики и антисептики однотипны для всех внутриматочных вмешательств. *Методика выполнения вмешательства зависит от опыта и выбора врача. Она может включать технику «свободной руки» или использование пункционного адаптера к ультразвуковому датчику с трассой продвижения иглы на экране монитора УЗ-сканера. Возможно использование одно- или двухигольного метода.* Предпочтительна пункция вены пуповины, в связи с меньшим количеством осложнений со стороны плода по сравнению с аспирацией крови плода из артерий. Пункция вены пуповины может проводиться в месте ее выхода из плаценты, на свободном участке петель пуповины вблизи места вхождения вены пуповины в брюшную полость плода или на ее внутрипеченочной части. В зависимости от взаиморасположения плаценты, петель пуповины и плода прохождение иглы к пунктируемому сосуду может осуществляться трансамниотально, трансплацентарно или трансплацентарно-трансамниотально (Михайлов А.В., 1996).

По нашим данным, предпочтительным является использование пункционного адаптера, двухигольного метода и трансамниотального доступа к вене пуповины на любом доступном ее участке. Этапы проведения КЦ приведены на рисунке 9.2. После соответствующей обработки передней брюшной стенки проводят детальное ультразвуковое исследование. Определяют место пункции таким образом, чтобы траектория движения иглы по возможности не проходила через плацентарную ткань, не затрагивала тела плода, а вена являлась близлежащим к датчику сосудом пуповины. Метод предусматривает использование двух игл. Первой иглой (18–20G, длиной 100–150 мм) через пункционный адаптер выполняют АЦ. После извлечения мандрена шприцом аспирируют необходимое количество околоплодной жидкости для последующего анализа. Через просвет первой иглы в амниотическую полость вводят вторую иглу (22–25G, длиной 150–200 мм) для непосредственного выполнения пункции вены пуповины. Конец иглы подводят к вене в проекции ее наибольшего диаметра и коротким, но резким движением осуществляют пункцию сосуда с введением конца иглы в его просвет. Расположение конца иглы в сосуде необходимо контролировать визуально. При расположении иглы в пупочной вене к ней подсоединяют



Рис. 9.2. Этапы выполнения трансабдоминального кордоцентеза.

гепаринизированный шприц объемом 1–2 мл и получают кровь плода. В зависимости от показаний к КЦ и от срока беременности извлекают 1–3 мл крови, после чего иглы медленно удаляют из полости матки. Успешность получения крови плода с первой попытки при проведении КЦ составляет 95–99% (Михайлов А.В., 1996, 1999).

Использование биопсийных адаптеров для игл снижает риск травматизации пуповины или смещения иглы во время взятия образца крови (Weiner С.Р. et al., 1991). Однако следует учитывать, что ограничение латеральной подвижности пунктированной петли пуповины в этом случае может затруднять

выполнение вмешательства, если возникает необходимость изменить положение иглы. В этих случаях иглу от пункционного адаптера можно отсоединить и продолжить манипуляцию.

Контроль качества образца крови, полученного при инвазивном вмешательстве, является важным этапом процедуры КЦ. Контаминация его кровью матери и амниотической жидкостью может снизить диагностическую ценность КЦ. Для дифференцирования плодовой и материнской крови предложено несколько тестов (Кузнецова Т.В. и др., 1999). В НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН применяют следующий тест. В пробирку, содержащую 5 мл дистиллированной воды, добавляют непосредственно перед употреблением 1 мл 0,25N NaOH. Затем добавляют 0,05 мл (1–2 капли) крови. Перемешивают содержимое пробирки покачиванием в течение 1 мин. Изменение цвета от розового до темного зелено-коричневого свидетельствует о присутствии в образце крови матери. Ярко-розовый цвет указывает на отсутствие контаминации.

Диагностические возможности исследования крови плода определяют и основные показания для КЦ. К ним относятся кариотипирование плода и диагностика моногенных заболеваний. Прямой анализ факторов свертывающей системы крови при гемофилии А и В и гемоглобина плода при β -талассемии долгое время оставались единственными методами ПД генных болезней (Weiner С.Р., 1964). Однако в связи с быстрым прогрессом молекулярно-генетических методов, получение крови плода только для диагностики моногенных болезней в настоящее время используется достаточно редко. Возможность кариотипирования с использованием в качестве материала лимфоцитов крови плода делают КЦ процедурой выбора для лабораторной диагностики хромосомных болезней во второй половине беременности.

Наиболее частым показанием для выполнения КЦ является диагностика гемолитической болезни плода, возникающей вследствие Rh(-) изоиммунизации матери. Величина титра Rh-антител в крови беременной женщины и исследование оптической плотности околоплодной жидкости не дают точной прогностической информации о состоянии плода (Weiner С.Р., 1964). КЦ и последующее исследование крови плода, извлеченной из вены пуповины, являются методом выбора

при диагностике и оценке степени тяжести гемолитической болезни. Переливание донорской крови плоду при помощи КЦ позволяет проводить лечение тяжелых форм этого заболевания (Михайлов А.В., 1999; Daffos F. et al., 1983).

Новые возможности в оценке состояния плода открыло применение КЦ для диагностики перинатальных инфекций. Идентификация специфических IgM в крови плода при токсоплазменной, цитомегаловирусной инфекциях, а также при краснухе позволяет установить наличие инфекционного поражения плода в антенатальном периоде и своевременно начать специфическую терапию. Использование ДНК-анализа позволяет также диагностировать парвовирусную инфекцию, вызывающую эритроцитарную аплазию, анемию и развитие неиммунного отека у плода. Своевременная диагностика инфекционных поражений плода открывает новые возможности для специфической внутриутробной терапии (Giovangrandi Y. et al., 1996).

Адекватная оценка состояния плода при осложненном течении беременности является одной из основных задач перинатальной медицины. Раннее появление тяжелых форм задержки развития, особенно сопровождающееся маловодием, даже при отсутствии структурных аномалий, нередко связано с наличием у плода хромосомной патологии. В подобной ситуации, по некоторым данным, ее риск составляет 6–16% (Weiner C.P., 1964; Soothill P.W., 1996). Существенный научный и практический интерес представляет исследование крови, извлеченной при КЦ, для оценки степени нарушения кислотно-основного, биохимического и гормонального состояния плода при осложненном течении беременности. Исследование крови плода актуально и при других осложнениях беременности, например, при сахарном диабете у матери.

Риск осложнений при выполнении КЦ минимален, однако его не следует недооценивать. Так, при наличии патологии у плода риск КЦ существенно выше. При оценке частоты осложнений КЦ в зависимости от показаний к его проведению, частота прерываний беременностей в течение 2 нед. после операции существенно варьирует. Она составляла 1,3%, если выполнялась при неосложненном течении беременности; 6,6% — в связи с выявлением у плода пороков развития; 13,8% — в связи с задержкой развития плода; и 25% — в связи

с неиммунным отеком (Maxwell D.J. et al., 1991). Эти данные согласуются с результатами исследований, проведенных в НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН (Баранов В.С. и др., 2002). Показано также, что частота осложнений не связана с наличием у беременных женщин локального напряжения миометрия, миоматозных узлов, рубца на матке после операции кесарева сечения и невынашивания беременности в анамнезе. Кроме того, риск осложнений после инвазивных вмешательств, выполненных в стационарных или в амбулаторных условиях, примерно одинаков (Михайлов А.В., 1999).

Безусловно, важное значение имеет метод, с помощью которого проводился забор крови плода, а также срок беременности на момент вмешательства. По данным литературы пункция внутрипеченочной части вены пуповины или кардиоцентез чаще осложняется антенатальной гибелью плода (6,2%) (Antsaklis A.L. et al., 1992). Обычно КЦ выполняется после 20-й недели беременности, но его проведение в более ранние сроки не сопряжено с достоверным повышением риска прерывания беременности, что, однако, в значительной степени определяется квалификацией оператора (Orlandi F. et al., 1990).

Кровотечения из места пункции сосуда пуповины после извлечения иглы отмечаются достаточно часто, приблизительно в 40% случаев. Из них только в 4–20% случаев продолжительность кровотечений составляет больше 60 с. При пункции артерии пуповины частота, интенсивность и длительность кровотечения существенно больше, чем при пункции вены пуповины. Увеличение длительности и частоты кровотечения отмечено при использовании пункционных игл диаметром больше, чем 22G, а также при тромбоцитопении у плода. При трансплацентарно-трансамниональном кордоцентезе в 40% случаев могут наблюдаться кровотечения в амниотическую полость из плодовой части плаценты. Обычно источником кровотечения являются межворсинчатые пространства плаценты, содержащие кровь матери. Несмотря на высокую тромбопластическую активность околоплодной жидкости, во избежание серьезных кровотечений при использовании трансплацентарного доступа необходимо исключить прохождение пункционной иглы через участки расширения межворсинчатого пространства и краевые синусы плаценты. Кровотечения из места пункции стенки матки при

трансамниональном доступе обычно не наблюдаются (Maxwell D.J. et al., 1991).

При ультразвуковом исследовании образование гематом в месте пункции пуповины в большинстве случаев не визуализируется. Однако при исследовании пуповины у плодов, родоразрешенных в течение 48 ч после КЦ, в 17% случаев обнаружены незначительные гематомы, которые не были выявлены при кардиотокографическом и доплерометрическом наблюдениях. Образование больших гематом в месте пункции описано в единичных случаях (Ludomirsky A. et al., 1988).

Более чем в 40% случаев после КЦ в крови у беременных женщин отмечается повышение уровня α -фетопротеина, что свидетельствует о наличии плодово-материнских микрогемотрансфузий, которые могут привести к изоиммунизации. При трансплацентарном доступе вероятность микрогемотрансфузий в 3–4 раза выше. Профилактика изоиммунизации является обязательной (Саггера J.M., Di Renzo G.C., 1993).

Хориоамнионит — одна из основных причин перинатальной смертности после КЦ, встречается приблизительно в 1% случаев. Описаны случаи гибели плодов, в тканях которых после КЦ обнаруживали стрептококк группы В, коринебактерии и др. В некоторых перинатальных центрах при проведении КЦ профилактически назначают применение антибиотиков (Maxwell D.J. et al., 1991).

КЦ не вызывает достоверного увеличения числа преждевременных родов. В группе женщин, подвергшихся вмешательству, частота преждевременных родов соответствует популяционной и составляет 5–6%. В 7% случаев непосредственно после КЦ отмечается повышение тонуса матки, которое может потребовать корригирующей терапии. Отслойка плаценты является очень редким осложнением КЦ. Она встречается в 0,1–0,3% случаев, обычно как позднее осложнение, непосредственно не связанное с операцией (Maxwell D.J. et al., 1991).

Самопроизвольно проходящая кратковременная брадикардия у плода, возникающая сразу после КЦ, встречается сравнительно часто (3–12%). Выраженная брадикардия чаще имеет место при исходно нарушенном состоянии плода в условиях осложненной беременности: задержке развития плода, наличии у него выраженной анемии и нарушения кислотно-основного состояния крови.

Даже при наименее травматичном — трансамниональном — подходе к пуповине КЦ связан с неизбежным повреждением стенки матки и эндотелия сосудов пуповины. В экспериментах на овцах показано, что при повреждении эндотелия сосудов пуповины происходит высвобождение определенного количества вазоактивных веществ, которые играют заметную роль в регуляции фетоплацентарного кровообращения (Chang J.-M. et al., 1992). Эндотелий является источником широкого спектра вазоактивных веществ, к которым, в частности, относятся простагландины, эндотелиальный релаксирующий фактор (NO), эндотелиины. При этом взаимодействие вазорелаксирующих и вазоконстрикторных агентов поддерживает оптимальный тонус сосудов фетоплацентарной системы (Громыко Г.Л., Шпаков, 1995). Одним из основных вазоактивных веществ, влияющих на тонус гладкомышечной мускулатуры сосудов, является оксид азота, выделение которого приводит к релаксации сосудов и уменьшению периферического сосудистого сопротивления (Collier J., Vallance P., 1991). Механизм высвобождения оксида азота при травме эндотелия до конца не изучен. Считается, что при повреждении сосудистой стенки происходит активация фермента эндотелиальной NO-синтазы, запускающей механизм высвобождения оксида азота из тканей (Graf R. et al., 1994). Клинические исследования гемодинамики плода в ответ на инвазивные вмешательства показали, что после выполнения КЦ происходит снижение сосудистой резистентности кровотоку в сосудах плаценты. Это проявляется в уменьшении доплерометрических индексов (Hecher K. et al., 1993). Вместе с тем, при травматизации эндотелия вены пуповины происходит значительное выделение мощного вазоконстриктора — эндотелина (Rizzo G. et al., 1996). Действуя как Ca^{2+} -мобилизирующий агент, эндотелиин способен приводить к сокращению сосудов плодово-плацентарной системы, при этом по мощности воздействия на фетальные сосуды он в 30 раз превосходит ангиотензин II.

В НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН установлено наличие определенной корреляции между степенью гемодинамических изменений в плодово-плацентарной системе, объемом извлеченной крови плода и сроком беременности, при котором выполнялся КЦ. Например, 1–3 мл крови, извлеченные при КЦ на 20–21-й н.б., составляют около 10% от ее фетоплацент-

тарного объема, что эквивалентно значительной кровопотере и достоверно влияет на состояние гемодинамики плода (Михайлов А.В., 1999).

Таким образом, КЦ не следует рассматривать как простое и совершенно безопасное инвазивное вмешательство. К этой операции следует прибегать в том случае, когда другие возможности получения плодного материала уже исчерпаны. Нам представляется для кариотипирования плода малооправданным предпочтение КЦ перед другими инвазивными вмешательствами, которое наблюдается в ряде отечественных лабораторий и центров ПД.

Важно напомнить, что забор крови плода с целью ПД является хирургической операцией, которая должна проводиться высококвалифицированными специалистами. Хирург должен иметь значительный опыт ультразвуковой диагностики в акушерстве и гинекологии, а также опыт выполнения других манипуляций, связанных с ПД. После приобретения определенных навыков хирург допускается к проведению операции КЦ под контролем более опытного врача и предпочтительно у пациенток, которым планируется прерывание беременности по медицинским показаниям во II триместре беременности (Angel J.L. et al., 1989). Недостаточный практический опыт приводит к увеличению частоты прерываний беременности (Boulot P. et al., 1990). Наш опыт работы подтверждает это положение. Только постоянная тренировка и выполнение большого числа операций делает инвазивную процедуру практически безопасной для матери и плода. Выполняемые нерегулярно, от случая к случаю, такие манипуляции могут представить определенный риск, величина которого примерно соответствует опыту и квалификации оперирующего акушера-гинеколога.

Представляется целесообразным затронуть также вопрос о некоторых организационно-методических аспектах применения инвазивных внутриматочных вмешательств. Являясь неотъемлемой частью ПД наследственных и врожденных болезней, данное клиническое направление всегда находится в зависимости от общих алгоритмов ПД и используемых лабораторных технологий. Например, во Франции, так же как и в большинстве зарубежных стран, абсолютное большинство инвазивных вмешательств с целью ПД составляет трансабдоминальный амниоцентез, что связано с широким использова-

Таблица 9.2

Количество и тип инвазивных вмешательств, проведенных в НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН с целью ПД наследственных болезней плода (2000–2004 гг.)

| Вид вмешательства | Абсолютное число инвазивных вмешательств за указанный период | | | | | Всего | |
|-------------------|--|------|------|------|------|------------------|-----|
| | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | Абсолютное число | % |
| Хорионбиопсия | 200 | 271 | 255 | 251 | 371 | 1354 | 34 |
| Плацентобиопсия | 271 | 292 | 514 | 416 | 342 | 1835 | 46 |
| Кордоцентез | 71 | 82 | 126 | 231 | 290 | 800 | 20 |
| Всего | 542 | 645 | 812 | 898 | 1003 | 3989 | 100 |

нием методики культивирования амниоцитов. В то же время, в нашей стране и в странах ближнего зарубежья удельный вес АЦ среди других инвазивных процедур ПД сравнительно невысок. Доминирующими ИМ в России остаются хорионбиопсия и плацентобиопсия. *В последнее время в ряде диагностических центров отмечается явная тенденция к более широкому использованию кордоцентеза. По нашему мнению, такое предпочтение вряд ли оправдано и скорее свидетельствует о наличии дефектов в организации пренатальной, прежде всего, цитогенетической диагностики в этих центрах.*

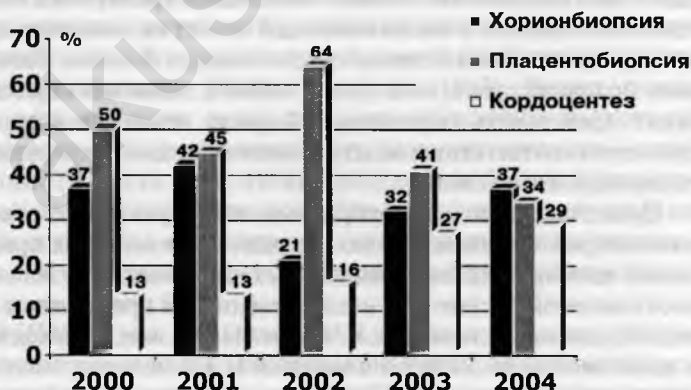


Рис. 9.3. Динамика и тип инвазивных внутриматочных вмешательств с целью пренатальной диагностики хромосомной патологии плода в 2000–2004 гг.

Совершенствование и внедрение новых методов обследования, распространение алгоритмов ПД в масштабах города, региона или страны также влияют на структуру и динамику различных типов инвазивных процедур. Как следует из таблицы 9.2 и рисунка 9.3, введение в Санкт-Петербурге в конце 2001 г. биохимического скрининга всех беременных II триместра, утверждение новых нормативных документов по ПД (Баранов В.С. и др., 2004), наконец, смещение приоритетов последних лет в пользу ПД на более ранние сроки беременности оказывают существенное влияние на динамику и тип инвазивной диагностики.

Вместе с тем, независимо от этих особенностей, уместно напомнить основные положения, которыми должен руководствоваться врач, выполняющий инвазивные вмешательства с целью забора плодного материала. Согласно рекомендациям Европейской ассоциации перинатальной медицины (Carrega J.M., Di Renzo G.C., 1993) применение ИМ в ПД должно проводиться с обязательным соблюдением следующих основных принципов:

- пациент должен получить максимально полную информацию относительно эффективности, риска и возможных осложнений каждого используемого ИМ;
- информация должна быть конфиденциальной и основана на индивидуальном подходе (рекомендуется снабжать каждого пациента печатной информацией о методах, применяемых в ПД);
- перед выполнением любого инвазивного вмешательства пациентка и, желательно, ее партнер должны подписать «информированное согласие», по которому они не только предоставляют право врачу на выполнение операции, но и представляют себе возможности, ограничения и потенциальные осложнения предполагаемого ИМ;
- инвазивные вмешательства должны выполняться только в специализированных перинатальных центрах высококвалифицированными специалистами;
- при получении неоднозначных результатов пациентка должна быть информирована о возможных альтернативных способах ПД;
- диагноз, установленный пренатально, должен быть подтвержден исследованием абортного материала или последующим обследованием новорожденного в целях

обеспечения пациента полной информацией для последующего пренатального консультирования;

- при выявлении аномалий развития плода и желании продолжать беременность пациентка должна быть обеспечена адекватной психологической поддержкой, а при необходимости досрочного прерывания беременности — адекватным методом его выполнения;
- необходимость использования ультразвукового сканирования при выполнении инвазивных вмешательств является общепризнанной;
- использование медикаментов до или после инвазивных вмешательств не является обязательным за исключением применения анти-D-иммуноглобулина у Rh(-) не иммунизированных беременных женщин при Rh(+) партнере.

Выполнение этих принципов является обязательным условием, гарантирующим беременной женщине режим «наибольшего благоприятствования» при проведении ПД с использованием ИМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инвазивные вмешательства, выполняемые под ультразвуковым контролем с целью забора плодного материала для последующего лабораторного анализа — одно из важнейших звеньев службы ПД. Кратко рассмотрены основные исторические этапы становления каждого из инвазивных методов, применяемых на разных сроках беременности: амниоцентеза, хорионбиопсии, плацентобиопсии, кордоцентеза. Приведены результаты ретроспективного анализа инвазивных вмешательств, их влияния на состояние плода и матери. На основании собственного опыта дается критическая оценка различных ИМ, рациональное использование которых минимизирует частоту послеоперационных осложнений и способствует повышению эффективности ПД. Рассмотрены факторы, определяющие тип применяемых инвазивных вмешательств, а также рекомендации к проведению инвазивной ПД, разработанные и утвержденные Европейской ассоциацией перинатальной медицины.

ГЛАВА X. ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ХРОМОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Цитогенетическая ПД — это часть комплекса лабораторно-диагностических исследований образцов плодного материала, полученных с помощью инвазивных внутриматочных вмешательств. Более 90% инвазивных диагностик проводится с целью цитогенетических исследований. Это объясняется большим удельным весом беременных, имеющих высокий риск рождения ребенка с хромосомной патологией.

10.1. ПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРЕНАТАЛЬНОГО КАРИОТИПИРОВАНИЯ

В подавляющем большинстве пренатальные цитогенетические исследования проводятся по следующим показаниям:

- 1) возраст беременной 35 лет и старше;
- 2) наличие в семье ребенка или выявление при предыдущей беременности плода с болезнью Дауна и другими хромосомными болезнями;
- 3) наличие в анамнезе ребенка или плода с множественными врожденными пороками;
- 4) аномалии кариотипа у родителей;
- 5) высокий риск рождения ребенка с хромосомной болезнью по результатам биохимического скрининга (биохимические маркеры болезни Дауна у плода);
- 6) пороки или отклонения развития, выявленные при ультразвуковом исследовании (ультразвуковые маркеры хромосомной патологии).

Показания к инвазивной диагностике с целью кариотипирования плода определяются по результатам трех программ пренатального скрининга — цитогенетического (группы 1–4), биохимического (группа 5) и ультразвукового (группа 6).

10.1.1. Возраст матери

Постулат об экспоненциальной зависимости частоты рождения ребенка с трисомией 21 от возраста матери, выдвинутый еще в 1933 г. известным английским генетиком L.S.Penrose, подтвержден многочисленными цитогенетическими исследованиями в постнатальном периоде онтогенеза, а также результатами ПД. Доказана линейная зависимость между возрастом женщины и частотой нерасхождения хромосом 13 и 18 при созревании яйцеклетки, а благодаря развитию методов вспомогательной репродукции – и хромосомы 16 (Jacobs P., Hassold T., 1995; Griffin D.K., 1996). В то же время, триплоидия, моносомия X, а также редкие трисомии по хромосомам групп А, В и С у потомства с возрастом матери не связаны (Eichenlaub-Ritter U., 1998; Jacobs P., Hassold T., 1995).

Говоря о формировании «возрастной» группы, уместно отметить, что частота рождения детей с хромосомными болезнями, включая синдром Дауна, повышена относительно популяционной и у молодых (до 22 лет) женщин (Фогель Ф., Мотульски А., 1989; Давиденкова Е.Ф. и др., 1994; Бочков Н.П., 1997; Hassold T., Hunt P., 2001).

Вопрос о влиянии возраста отца на возникновение геномных мутаций до сих пор окончательно не решен. Показано, что с возрастом у мужчин повышается частота сперматозоидов со структурными aberrациями и дисомией хромосом 1, YY, XX и XY (Guttenbach M. et al., 1997; Griffin D.K., 1996). Однако если влияние возраста на расхождение хромосом в сперматогенезе и существует, то оно в 10–100 раз менее выражено, чем в оогенезе (Abruzzo M.A., Hassold T.J., 1995). Поэтому возраст отца обычно не учитывается при определении показаний к кариотипированию плода.

На основе этих наблюдений разработаны таблицы возрастного риска рождения ребенка с наиболее частыми хромосомными болезнями, учитывающие и срок беременности (Снайдерс Дж., Николаидес К., 1997; Carrera J.M., Di Renzo G.C., 1993). Эти таблицы (табл. 10.1) широко используются при медико-генетическом консультировании в рамках ПД. Положения об увеличении частоты плодов с трисомией 21 у беременных «младших» и «старших» возрастных групп, а также об отсутствии положительной корреляции между возрастом матери и частотой моносомии X у плода наглядно иллюстрируют результаты цитогенетической ПД (рис. 10.1).

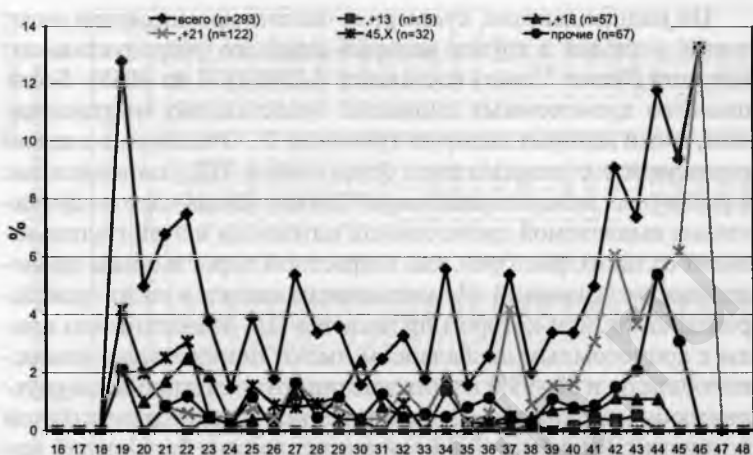


Рис. 10.1. Частота хромосомных болезней, выявленных при пренатальном кариотипировании, у беременных разного возраста (без учета показаний к инвазивной пренатальной диагностике и срока беременности). По оси абсцисс – возраст беременной (в годах), по оси ординат – частота плодов с геномными мутациями (в % от общего числа пренатальных диагностик, выполненных в каждой возрастной группе). Группа «Прочие» объединяет случаи 47,XXX, 47,XXY, 47,XYY, аутосомные трисомии 7, 9, 22, а также триплоидии.

Частота плодов с другими геномными мутациями вполне сопоставима с распространенными анеуплоидиями (трисомии 21, 13, 18, моносомия X), особенно у молодых женщин.

Согласно многолетним данным, полученным в разных странах, критическим («переломным») в плане риска хромосомных болезней у потомства считается возраст 35 лет. Поэтому именно с 35 лет женщинам рекомендуется инвазивная ПД с целью исключения хромосомной болезни у плода (Carrera J.M., Di Renzo G.C., 1993). Однако возрастные критерии службы ПД в разных странах варьируют в диапазоне 34–40 лет. В России рекомендуется проведение ПД всем беременным старше 35 лет (Приказ МЗ РФ №457 от 28.12.2000). В любом случае, группа «возрастных» беременных является самой многочисленной и составляет 34–83% от всех цитогенетических ПД (Caspari D. et al., 1994; Breed A.S.P.M., 1992; Wegner R.D., 1993; Stranc L.C. et al., 1994; Кузнецова Т.В. и др., 1997; Kuznetzova T.V. et al., 1998).

По нашим данным, суммарная частота хромосомной патологии у плодов в группе матерей старшего репродуктивного возраста (более 35 лет) составляет 4,25% (173 из 4068). Большинство хромосомных аномалий представлено анеуплоидиями, среди которых лидирует трисомия 21. Эти данные в целом согласуются с результатами сотен тысяч ПД, выполненных в различных лабораториях мира. Однако общая частота пренатально выявляемой хромосомной патологии в этой группе зависит от таких факторов, как возрастной порог и объем проведенных исследований. Немаловажным является также срок беременности, при котором проводится ПД. Известно, что плоды с хромосомным дисбалансом имеют пониженную жизнеспособность, и 50–99% из них элиминируются в процессе внутриутробного развития. Соответственно, частота хромосомной патологии, выявленной в I триместре, должна быть выше, чем во II триместре беременности. Действительно, если учитывать только фактор возраста, то результативность пренатального кариотипирования в группе беременных старше 39 лет в I триместре (7,3%) оказывается в 1,5 раза выше, чем во II (5,0%) (см. табл. 10.2, группы 3 и 2 соответственно).

Комментируя данные о частоте хромосомной патологии, уместно напомнить, что результаты трех типов скрининга — цитогенетического, биохимического и ультразвукового различаются по своей прогностической значимости. Анализ собственных данных (см. табл. 10.2) показывает, что использование биохимического теста у беременных 39 лет и старше при «cut off» = 0,5%, что соответствует риску 35–36-летней женщины в 15–18 нед. беременности (табл. 10.1), не позволяет отказаться от пренатального кариотипирования по возрастному риску, избрав его в качестве ведущего фактора. Так, при снижении возрастного риска хромосомных болезней у плода в результате нормальных показателей АФП и ХГЧ частота трисомии 21 в этой группе падает, однако остается сопоставимой с таковой у беременных моложе 39 лет (группы 2б и 1). При сохранении или увеличении возрастного риска случаи выявления хромосомной патологии, в том числе и трисомии 21, учащаются (группа 2а). Следует также отметить, что при изменениях маркерных сывороточных белков, не характерных для синдрома Дауна, невыявленными могут остаться плоды с другой хромосомной патологией. Данные, представленные в таблице 10.2 и на рисунке 10.1, свидетельствуют

**Риск рождения ребенка с хромосомной патологией с учетом возраста матери и срока беременности
(Снайдерс Р.Дж.М., Николаидес К.Х., 1997)**

| Возраст, лет | 9—14 нед. беременности | | | 15—20 нед. беременности | | | На момент рождения | | |
|--------------|------------------------|-------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|
| | Трисомия 21 | Трисомия 18 | Трисомия 13 | Трисомия 21 | Трисомия 18 | Трисомия 13 | Трисомия 21 | Трисомия 18 | Трисомия 13 |
| 20 | 1/696 | 1/2193 | 1/6125 | 1/1025 | 1/4576 | 1/15656 | 1/1529 | 1/15507 | 1/36148 |
| 21 | 1/687 | 1/2164 | 1/6042 | 1/1012 | 1/4514 | 1/15444 | 1/1508 | 1/15298 | 1/35660 |
| 22 | 1/675 | 1/2126 | 1/5936 | 1/994 | 1/4435 | 1/15172 | 1/1482 | 1/15029 | 1/35031 |
| 23 | 1/659 | 1/2077 | 1/5800 | 1/971 | 1/4333 | 1/14824 | 1/1448 | 1/14684 | 1/34228 |
| 24 | 1/640 | 1/2015 | 1/5628 | 1/942 | 1/4204 | 1/14385 | 1/1405 | 1/14249 | 1/33214 |
| 25 | 1/616 | 1/1939 | 1/5414 | 1/906 | 1/4045 | 1/13839 | 1/1352 | 1/13708 | 1/31954 |
| 26 | 1/586 | 1/1846 | 1/1554 | 1/863 | 1/3850 | 1/13174 | 1/1287 | 1/13049 | 1/30417 |
| 27 | 1/551 | 1/1735 | 1/4844 | 1/811 | 1/3619 | 1/12382 | 1/1209 | 1/12265 | 1/28588 |
| 28 | 1/510 | 1/1606 | 1/4485 | 1/751 | 1/3351 | 1/11464 | 1/1120 | 1/11356 | 1/26469 |
| 29 | 1/464 | 1/1462 | 1/4082 | 1/683 | 1/3050 | 1/10434 | 1/1019 | 1/10336 | 1/24092 |
| 30 | 1/415 | 1/1306 | 1/3646 | 1/610 | 1/2724 | 1/9320 | 1/910 | 1/9232 | 1/12520 |
| 31 | 1/363 | 1/1143 | 1/3193 | 1/535 | 1/2385 | 1/8161 | 1/797 | 1/8083 | 1/18842 |
| 32 | 1/311 | 1/981 | 1/2739 | 1/459 | 1/2046 | 1/7001 | 1/684 | 1/6935 | 1/16165 |
| 33 | 1/262 | 1/825 | 1/2303 | 1/386 | 1/1721 | 1/5887 | 1/575 | 1/5832 | 1/13594 |
| 34 | 1/216 | 1/681 | 1/1901 | 1/318 | 1/1420 | 1/4859 | 1/475 | 1/4813 | 1/11218 |
| 35 | 1/175 | 1/552 | 1/1542 | 1/258 | 1/1152 | 1/3942 | 1/385 | 1/3905 | 1/9102 |
| 36 | 1/140 | 1/411 | 1/1233 | 1/206 | 1/921 | 1/3151 | 1/308 | 1/3121 | 1/7274 |
| 37 | 1/111 | 1/348 | 1/973 | 1/163 | 1/727 | 1/2486 | 1/243 | 1/2463 | 1/5740 |
| 38 | 1/86 | 1/272 | 1/760 | 1/127 | 1/567 | 1/1941 | 1/190 | 1/1923 | 1/4482 |
| 39 | 1/67 | 1/211 | 1/588 | 1/98 | 1/439 | 1/1503 | 1/147 | 1/1489 | 1/3470 |
| 40 | 1/51 | 1/162 | 1/452 | 1/76 | 1/338 | 1/1156 | 1/113 | 1/1145 | 1/2668 |
| 41 | 1/39 | 1/124 | 1/346 | 1/58 | 1/258 | 1/884 | 1/86 | 1/875 | 1/2040 |
| 42 | 1/30 | 1/94 | 1/263 | 1/44 | 1/197 | 1/673 | 1/66 | 1/667 | 1/1554 |
| 43 | 1/23 | 1/72 | 1/200 | 1/33 | 1/149 | 1/511 | 1/50 | 1/506 | 1/1179 |
| 44 | 1/17 | 1/54 | 1/151 | 1/25 | 1/113 | 1/387 | 1/38 | 1/383 | 1/893 |
| 45 | 1/13 | 1/41 | 1/114 | 1/19 | 1/85 | 1/292 | 1/29 | 1/289 | 1/675 |

Таблица 10.2

Результаты пренатального кариотипирования в I и II триместрах беременности в разных возрастных группах за 2002–2003 гг.

| Характеристика группы | | Риск синдрома Дауна по результатам биохимического скрининга | Численность группы | Выявлено хромосомной патологии у плода | |
|-----------------------|--|---|--------------------|--|--------------------|
| | | | | Всего (%) | С трисомией 21 (%) |
| 1. | <39 лет | >0,5% | 435 | 10* (2,3) | 7** (1,6) |
| 2. | >39 лет, II триместр, всего | | 411 | 21 (5,1) | 13 (3,2) |
| | в т.ч. риск: | | | | |
| | 2а. > возрастного | >0,5% | 20 | 3 (15,0) | 2 (10,0) |
| | 2б. < возрастного | <0,5% | 49 | 1 (2,0) | 0 (0) |
| | 2в. только возрастной | нет данных | 342 | 17 (5,0) | 11 (3,2) |
| 3. | >39 лет, I триместр (только возрастной риск) | | 232 | 17 (7,3) | 10 (4,3) |

* В том числе 4 – у женщин 35–38 лет.

** В том числе 3 – у женщин 35–38 лет.

о том, что такие случаи не редкость. Следует отметить также, что по результатам биохимического скрининга в группу высокого риска попадают только 65–70% плодов с синдромом Дауна (см. главу VII).

Аналогичная ситуация наблюдается и при проведении УЗ-скрининга у возрастных беременных. Так, в группе женщин старше 35 лет из 15 случаев хромосомных болезней увеличение ТВП более 2,5 мм зарегистрировано у 9 плодов, а носовая кость не визуализировалась лишь в 4 случаях. Среди плодов, не имеющих этих УЗМ, в 3 случаях установлена трисомия 21. Эффективность скрининга по ТВП – специфичному для хромосомных болезней УЗМ в I триместре у плода при возрасте матери старше 35 лет, согласно нашим данным (Некрасова Е.С., 2005), составляет всего 60%. Напомним также, что и при скрининге во II триместре не более чем у 40% плодов с синдромом Дауна обнаруживаются ультразвуковые маркеры или тяжелые пороки развития (Снайдерс Р.Дж.М., Николаидес К.Х., 1997).

Справедливости ради следует отметить, что результаты комбинированного биохимического и УЗ-скрининга в I триместре беременности позволяют сократить число инвазивных вмешательств у возрастных беременных. Однако приведенные выше данные наглядно иллюстрируют их низкую эффективность и нецелесообразность их массового применения в «старшей» возрастной группе. Скрининговые программы в этой группе лишь сдвигают на более поздние сроки не только пренатальное кариотипирование, но и прерывание беременности, что вряд ли оправданно.

10.1.2. Наличие в семье ребенка или выявление плода с болезнью Дауна и другими хромосомными болезнями при предыдущей беременности

Риск повторения анеуплоидии при нормальных кариотипах родителей оценивается выше, чем средний популяционный. Так, для матерей моложе 35 лет эмпирический риск составляет около 1%, а в возрасте 35 лет и старше — удвоенный для данной возрастной группы (Козлова С.И. и др., 1996). Суммарная частота хромосомной патологии, выявленной пренатально в этой группе беременных, составила 2,6% (13 из 498).

В качестве факторов, увеличивающих возрастную риск, рассматриваются хромосомный мозаицизм, гетероморфизм гомологов, а также мутации в специфических генах (гены «предрасположенности» к нерасхождению хромосом).

Мозаицизм хромосом (МХ) — наличие клеточных линий с различным хромосомным набором нередко выявляется при кариотипировании родителей пациентов с хромосомными синдромами (Murthy K.D.S., Farag T. I., 1995). В этих случаях повторный риск рождения ребенка с той же хромосомной патологией рассчитывается по формуле $(x/2-x) \times K$, где x — доля аномального клеточного клона, K — коэффициент элиминации несбалансированной зиготы. Величина K устанавливается на основании соотношения частоты данной трисомии среди абортусов и новорожденных. Для трисомии 21 она равна 0,5, а для трисомий 13 и 18—0,25 (Козлова С.И. и др., 1996; Казаков В.И. и др., 2002).

Многие случаи фенотипически не проявляющегося хромосомного мозаицизма, особенно при малой пропорции аномальных клеток, остаются нераспознанными. Проблему диагностики «скрытого» мозаицизма, т.е. недоступного для

выявления при стандартном кариотипировании, иногда удается решить с помощью более чувствительных специальных методов исследования: FISH и ПЦР (Вяткина С.В. и др., 2003). Мозаичный кариотип может быть ограничен только какой-либо одной тканью (*ограниченный тканевой мозаицизм*) или представлен во всех тканях организма (*генерализованный, или истинный мозаицизм*). На практике заключение о кариотипе основывается на результатах цитогенетического и ДНК-анализа лимфоцитов, а регистрируемый мозаицизм относится либо к истинному, либо к ограниченному лимфоидной тканью. Очевидно, что установление характера мозаицизма требует изучения клеток различных тканей, что, как правило, не представляется возможным. Для прогноза потомства имеет значение присутствие аномального хромосомного клона в гонадах, т.е. *гонадный мозаицизм*. Прямые доказательства его существования могут быть получены при исследовании хромосомного набора тканей гонад и пулов генеративных клеток. Такие исследования возможны лишь на материале биоптата гонад и на практике не используются. Косвенным доказательством наличия гонадного мозаицизма являются случаи рождения двух и более детей с одной и той же хромосомной патологией у родителей с нормальным кариотипом. Однако в таких семьях повторное рождение детей с геномными мутациями нельзя объяснить только гонадным мозаицизмом. Рождение sibсов с различными анеуплоидиями свидетельствуют в пользу существования и других факторов риска.

Среди факторов, влияющих на поведение хромосом, следует упомянуть структурный гетероморфизм гомологов, обусловленный сочетанием резко различающихся вариантов некоторых хромосом в кариотипе родителей. В первую очередь, это районы 1qh, 9qh и 16qh, которые характеризуются различиями не только в размерах блоков конститутивного гетерохроматина, но и нуклеотидным составом и числом повторов альфоидных ДНК, входящих в их состав. Предполагалось, что полиморфизм гетерохроматиновых районов этих хромосом, а также прицентромерных районов акроцентрических хромосом и увеличенный район Yqh могут способствовать аномальной сегрегации хромосом в анафазе первого или второго делений мейоза (Назаренко С.А., 1993; Dernburg A.F. et al., 1996). Однако результаты исследований методом FISH с использованием специфичного к центромерному району хро-

мосомы 21 ДНК-зонда (α RI-6) не подтверждают участие альфоидных ДНК в аномальной сегрегации хромосом 21 (Vorsanova S.C. et al., 2003). Прямых доказательств негативно-го влияния гетероморфизма гетерохроматиновых блоков хромосом 1, 9, 16 и Y на поведение других хромосом в мейозе также не получено.

К «цитогенетическим» факторам нерасхождения хромосом групп D и G часто относят особенности их коротких плеч, которые являются компонентами ядрышка и могут влиять на расхождение хромосом. В частности, широко обсуждалась проблема корреляции между аномальной сегрегацией хромосом в мейозе и образованием устойчивых ассоциаций ядрышкообразующих хромосом, регистрируемых в соматических клетках, а также присутствием в кариотипе одного из супругов экстра-варианта ядрышкообразующего района, так называемого *двойного ЯОР (дЯОР)* (Jackson-Cook C.K. et al., 1985; Trzepizur K. et al., 1995; Jacobs P., Hassold T., 1995). Поскольку при трисомии 21 дополнительная хромосома, как правило, наследуется от родителя-носителя дЯОР, предполагалось, что именно этот хромосомный полиморфизм влияет на расхождение других акроцентрических хромосом (Mitte S. et al., 1980; Jackson-Cook C.K. et al., 1985). Вместе с тем, имеющиеся к настоящему времени данные не подтверждают устойчивого влияния структурно-функциональных особенностей коротких плеч акроцентрических хромосом на их поведение в мейозе.

При обсуждении факторов, влияющих на возникновение численных aberrаций, нельзя обойти вниманием гены, мутации в которых могут привести к нарушениям сегрегации хромосом. Специфические «мейотические» мутации у человека, в отличие от модельных объектов, пока не идентифицированы. Однако известно уже около 20 генов, некоторые аллельные варианты которых ассоциированы с нерасхождением хромосом в мейозе и в митозе. Продукты этих генов входят в состав митотического веретена, контролируют синтез нуклеиновых кислот, являются ферментами системы репарации ДНК, белками рекомбинации мейотических хромосом, а также системы детоксикации ксенобиотиков.

Многочисленные факты повторного рождения детей с хромосомной патологией, прослеживаемые в нескольких поколениях, свидетельствуют в пользу существования наследственной

предрасположенности к нерасхождению хромосом. Однако конкретные механизмы возникновения повторных анеуплоидий остаются неясными.

10.1.3. Наличие в анамнезе ребенка (плода) с МВПР

Множественные врожденные пороки развития (МВПР) характерны для большинства хромосомных болезней. Если среди всех врожденных пороков на долю связанных с хромосомным дисбалансом приходится около 6% (Kalter H., Warkany J., 1983), то среди МВПР удельный вес хромосомных болезней может достигать 51% (Лазюк Г.И., 1979). Поэтому цитогенетическим исследованиям отводится ведущая роль при определении причин МВПР. В подавляющем большинстве случаев МВПР не совместимы с жизнью, и кариотипирование плода (ребенка) не проводится, а заключение о возможном хромосомном дисбалансе основывается на результатах патоморфологических или УЗ исследований.

Следует подчеркнуть, что без цитогенетического подтверждения того или иного хромосомного синдрома вопрос об этиологии МВПР остается открытым. *Прогноз повторного рождения ребенка с МВПР зависит исключительно от того, насколько точно установлена причина МВПР у предыдущего ребенка или плода у родителей с нормальным кариотипом.* Так, в случае хромосомных синдромов средний риск повторения составляет не более 1%, а в случаях нехромосомных — на порядок выше (9–10%), причем для рецессивно-наследуемых моногенных форм он составляет около 5% (Лазюк Г.И. и др., 1983).

Всего в группе беременных, имеющих в анамнезе ребенка или плода с МВПР, нами было выполнено 182 пренатальных диагностики, и в 4 случаях были выявлены плоды с хромосомной патологией (2,2%). Таким образом, частота хромосомных болезней у плода в этой группе выше популяционной (0,6%). Однако причины МВПР у детей при предыдущей беременности при отсутствии подробных сведений об их характере остаются неясными, так как фенотипическая гетерогенность характерна для всех МВПР, независимо от их этиологической причины. В тех случаях, когда МВПР обусловлены хромосомными аномалиями, то для диагностики достаточно анализа кариотипа, тогда как при других МВПР цитогенетическое исследование лишь отвергает хромосомную природу

данного комплекса пороков, но не позволяет установить его этиологию. Следовательно, при наличии в семье ребенка с МВПР неясной этиологии нормальный кариотип у плода при следующей беременности не является гарантией рождения здорового ребенка. В некоторых случаях МВПР могут быть обусловлены микрохромосомными перестройками, для диагностики которых стандартные методы кариотипирования не пригодны. Поэтому при подозрении на моногенные или микрохромосомные синдромы необходимо провести обследование больного ребенка и родителей, а при планировании инвазивного вмешательства — предусмотреть получение плодного материала для диагностики молекулярными методами. Следует помнить также, что генетическую природу многих МВПР установить не удастся. Поэтому после исключения наследственной патологии всеми доступными методами, адекватными для каждого конкретного случая, целесообразно рекомендовать УЗИ в динамике, приурочивая его проведение к максимально информативным срокам, позволяющим исключить пороки, установленные у предыдущего сибса.

10.1.4. Аномалии кариотипа у родителей

Наличие структурных перестроек или численных аномалий хромосом у одного из родителей приводит к образованию несбалансированных гамет и увеличивает вероятность рождения ребенка с хромосомной патологией. Носители аномального кариотипа относятся также к группе высокого риска по *однородительской дисомии (ОРД) у плода. ОРД характеризуется присутствием в кариотипе удвоенного хромосомного материала только одного из родителей при отсутствии этого же материала другого родителя* (Назаренко С.А., Саженова Е.А., 2004). В постнатальном периоде ОРД может проявиться в виде «*болезней импринтинга*» (см. 10.3.3).

Сбалансированные структурные перестройки хромосом. Частота носителей сбалансированных структурных перестроек хромосом значительна и составляет примерно 1:400 в популяции (Carrera J.M., Di Renzo G.C., 1993) или 1:500 новорожденных (Papp Z., 1990). Частота супружеских пар, в которых один из партнеров является носителем сбалансированной хромосомной аберрации, составляет примерно 1/100–200 (Boué A., 1995). В структуре обращаемости на ПД эта катего-

рия пациентов весьма немногочисленна и составляет от 0,5 до 5% (Золотухина Т.В., Кухаренко В.И., 1990; Stranc L.C. et al., 1994). При этом в супружеских парах, направляемых на ПД, мужчины—носители структурных перестроек встречаются в 1,3–3,3 раза реже, чем женщины (Daniel A. et al., 1989). Этот факт объясняется тем, что носительство транслокаций зачастую сопровождается нарушениями сперматогенеза разной степени тяжести, вплоть до полной стерильности.

Вероятность образования нормальной или генетически сбалансированной зиготы, а также последствия развития генетически неполноценной зиготы определяются типом перестройки, спецификой вовлеченных в нее хромосом, локализацией в них точек разрыва, а также родительским происхождением aberrантной хромосомы. С учетом этих факторов и типа сегрегации aberrантных хромосом в мейозе разработаны схемы и таблицы, согласно которым можно рассчитать эмпирический риск рождения ребенка с aberrантным кариотипом (Козлова С.И. и др., 1996; Daniel A. et al., 1989; Cans C. et al., 1993). Средний эмпирический риск хромосомных болезней у потомства в семьях, где один из супругов является носителем какой-либо транслокации, варьирует в зависимости от типа перестройки (5,4–11,6%) и от сроков диагностики (13,3% — в I триместре и 8,5% — во II) (Boué A., Gallano P., 1984; Carrega J.M., Di Renzo G.C., 1993).

Робертсоновские транслокации, или *центрические слияния акроцентрических хромосом*, являются наиболее распространенным типом хромосомных аномалий. Их общая частота составляет 1:1000 новорожденных, при этом в 74% случаев транслокации затрагивают хромосомы 13 и 14 (Solari A.J., 1999). В структуре обращаемости на ПД лидерами оказываются носители $der(13;14)$ и $der(14;21)$ (Boué A., 1995). Центрические слияния других хромосом групп D и G встречаются гораздо реже.

Риск рождения детей с несбалансированным кариотипом, как и самопроизвольных выкидышей, у носителей робертсоновских транслокаций существенно варьирует в зависимости от хромосом, вовлеченных в слияние, а также от пола носителя. Поскольку у мужчин—носителей транслокаций 13;14, 14;21, 21;22 дисомия по хромосомам 13 и 21 составляет примерно 1/3 от всех несбалансированных сперматозоидов, теоретический риск рождения ребенка с трисомией 13 или 21 со-

ставляет 0–10% (Guttenbach A. et al., 1997). При материнском носительстве транслокации 14;21 вероятность рождения ребенка с трисомией 21 возрастает и оценивается в 10–15% (Boué A., 1995).

В случае центрического слияния гомологичных хромосом прогноз потомства неблагоприятен. Теоретически такие робертсоновские транслокации возможны для всех 5 пар акроцентрических аутосом. Однако более распространенными являются транслокации 21;21 и реже 13;13 и 22;22. Риск рождения детей с трисомией 21, 13 и 22 при центрическом слиянии гомологичных хромосом оценивается в 100%. Такая ситуация объясняется образованием только двух типов гамет – несущих транслокацию и, следовательно, дисомных по хромосомам, вовлеченным в перестройку, и гамет с нулисомией по какой-либо из этих хромосом. Образующиеся после оплодотворения нормальными гаметами зиготы – моносомные по любой из хромосом групп D и G или трисомные по хромосомам 14 и 15 – не способны к развитию (Фогель Ф., Мотульски А., 1989; Козлова С.И. и др., 1996).

Частота гетерозигот по *реципрокным транслокациям* оценивается величиной 1:600 супружеских пар (Crandall B.F. et al., 1980). Реальный риск рождения жизнеспособных детей с несбалансированным кариотипом определяется специфической хромосом, вовлеченных в транслокацию, размерами транслоцированных сегментов и полом носителя. Максимальная частота рождения ребенка с пороками развития достигает 40% (Cans C. et al., 1993). Эмпирический риск составляет в среднем 14% при отцовском носительстве транслокации и 18% – при материнском (Козлова С.И. и др., 1996).

Следует подчеркнуть, что наличие аберрантных хромосом в кариотипе родителей увеличивает также риск однородительской дисомии у плода – по целым хромосомам при робертсоновских и по участкам, задействованным в перестройке (т.е. сегментной дисомии) – при реципрокных транслокациях.

Носители *парацентрических инверсий*, не изменяющих морфологию хромосомы, регистрируются только при наличии несбалансированного кариотипа у их детей с пороками развития. Частота парацентрических инверсий в популяции оценивается как крайне низкая. *Перицентрические инверсии*, сопровождающиеся морфологическими изменениями хромосомы, представлены достаточно широко и исследованы более

детально (Madan K. et al., 1984). Фертильность у гетерозигот по парацентрическим инверсиям, как правило, не нарушена, тогда как 12% носителей перичентрических инверсий, особенно крупных хромосом, стерильны (Guttenbach et al., 1997). Особенности гаметогенеза определяются локализацией точек разрыва, а также размерами инвертированного участка. Так, у носителей протяженной инверсии зарегистрирована высокая (25–30%) частота несбалансированных сперматозоидов (Navarro J. et al., 1993), в то время как у гетерозигот по короткому инвертированному сегменту несбалансированных сперматозоидов не обнаружено. Показано также, что у фертильных мужчин соотношение сперматозоидов с инвертированной и нормальной хромосомами фактически не отличается от 1:1 (Guttenbach A. et al., 1997).

Что касается инверсий прицентромерных гетерохроматиновых районов хромосом 1, 9 и 16, вопрос о том, являются ли они структурными перестройками или вариантами полиморфизма нормального кариотипа, решен в пользу полиморфизма. Согласно последней версии Международной номенклатуры хромосом (ISCN, 1995) они обозначаются как 1ph, 9ph и 16ph вместо традиционной для инверсий аббревиатуры inv. Следует отметить, что и ранее локализация прицентромерного гетерохроматинового района на коротких плечах хромосом 1, 9 и 16, равно как и хромосомы 19, рассматривалась как «физиологические» варианты нормального кариотипа (Прокофьева-Бельговская А.А., 1969). Наиболее часто в популяции (1–3%) представлен полиморфизм прицентромерного гетерохроматина хромосомы 9 – варианты 9ph и реже 9phqh. Среди носителей варианта 9ph женщины встречаются в 1,7 раза чаще, чем мужчины (Yamada K., 1992).

Многие исследователи придерживаются мнения о структурной и функциональной нейтральности инверсий прицентромерных гетерохроматиновых районов (Назаренко С.А., 1993). Между тем, данные некоторых авторов (Акопян Г.Ф., 1988; Yamada K., 1992) не позволяют полностью исключить негативную роль 9ph в сегрегации мейотических хромосом и ее связь с привычным невынашиванием.

Принимая во внимание отсутствие единой точки зрения о роли инверсий хромосом в проблемах репродукции и единых рекомендаций о ПД у носителей таких перестроек, рассмотрим этот вопрос подробнее.

Таблица 10.3

Частота хромосомного дисбаланса и акушерской патологии у носителей структурных aberrаций хромосом (согласно анамнестическим данным)

| Хромосомная aberrация | Всего в группе | Спонтанные аборт | Ребенок с хромосомной болезнью | Ребенок с множественными пороками развития |
|------------------------------|----------------|------------------|--------------------------------|--|
| Реципрокные транслокации | 46 | 16 (37,8%) | 2 (4,3%) | 6 (13,0%) |
| Робертсоновские транслокации | 40 | 9 (22,5%) | 11 (27,5%) | 3 (7,5%) |
| 9ph | 130 | 17 (22,3%) | 6 (4,6%) | 13 (9,9%) |

Согласно обобщенным данным нашего Центра, вариант 9ph был зарегистрирован у 130 плодов. В 34 случаях носителем 9ph была мать, в 29 — отец, в одном случае — оба родителя. В 66 случаях родительская принадлежность осталась неизвестной. При пренатальном кариотипировании установлено преимущественное наследование хромосомы с инверсией гетерохроматинового района независимо от родительского происхождения (45 случаев из 63). Несбалансированный кариотип (трисомия 18 — 2 случая, трисомия 22, 47,XXX и 47,XXY), установлен у 5 плодов, причем хромосомный дисбаланс во всех случаях сочетался с наличием 9ph. Таким образом, частота плодов с несбалансированным кариотипом в группе носителей 9ph оказалась достаточно высокой — 5 из 130 (3,8%), что пятикратно превышало популяционную частоту хромосомных аномалий в пренатальном онтогенезе (0,6%).

При анализе анамнестических данных частота детей с хромосомными болезнями у родителей-носителей 9ph также оказалась в 5 раз выше, чем популяционная (табл.10.3), а частота спонтанных абортов и рождение детей с МВНР оказались сопоставимыми с таковыми у гетерозигот по реципрокным и робертсоновским транслокациям.

Таким образом, *наши данные свидетельствуют против нейтральности инверсии прицентромерного гетерохроматина хромосомы 9*. Они, скорее, показывают, что *вариант 9ph может влиять на нерасхождение хромосом, а также увеличивать вероятность спонтанного прерывания беременности и рождения*

детей с множественными пороками развития. Эти выводы хорошо согласуются с результатами крупномасштабных популяционных исследований в Японии (Yamada K., 1992). Следует подчеркнуть, однако, что статистические данные, касающиеся эффекта 9p_h, обычно ограничиваются сравнением частот той или иной патологии в группе носителей и в норме (в популяции). Эти исследования, как правило, не подкреплены изучением происхождения анеуплоидии, что принципиально важно для понимания эффекта изучаемой хромосомной аберрации. Невозможно также оценить вклад каждого из супругов в осложненный репродуктивный анамнез. Поэтому вопрос о влиянии варианта 9p_h на аномальную сегрегацию хромосом, равно как и его участие в других репродуктивных проблемах, по-прежнему нельзя считать окончательно решенным. Вместе с тем, *приведенные данные позволяют отнести носителей варианта 9p_h в группу повышенного риска и приотягощенном акушерском анамнезе рекомендовать им пренатальное кариотипирование.*

Численные аномалии кариотипа, обусловленные дисбалансом по половым хромосомам или наличием дополнительных маркерных хромосом, совместимы с деторождением. Однако они в той или иной мере влияют на процессы созревания гамет и при сохранении репродуктивной функции увеличивают риск рождения больного ребенка.

Общая частота носителей *численных аномалий половых хромосом* в популяции оценивается в 0,43% (Spriggs E.L. et al., 1996).

При синдроме Клайнфелтера (кариотип 47,XXY) частота сперматозоидов с дисомией половых хромосом (XX и XY) на порядок выше, чем таковых в образцах эякулята у пациентов с нормальным кариотипом. Для индивидуумов 47,XYX характерно увеличение частоты сперматозоидов, несущих одновременно X и Y хромосомы. *Таким образом, риск рождения детей с синдромами трипло-Х, Клайнфелтера и дисомией Y у таких мужчин оказывается повышенным.*

Синдром трипло-Х в большинстве случаев не сопровождается отклонениями в психическом, физическом и половом развитии. Лишь у некоторых индивидов отмечаются нарушения репродуктивных функций (аменорея, дисменорея, ранняя менопауза и др.) или слабо выраженные аномалии развития наружных половых органов, а в редких случаях — легкая форма умственной отсталости. Как правило, женщины с ка-

риотипом 47,XXX имеют нормальную репродуктивную функцию, однако у них повышен риск спонтанных абортс и/или рождения ребенка с анеуплоидным кариотипом (Mugthy K.D.S., Farag T.I., 1995).

Беременность у пациенток с *синдромом Шерешевско-го–Тернера* – событие очень редкое. Репродуктивная функция сохраняется только у некоторых носительниц aberrантной X-хромосомы, как правило, с делециями короткого плеча (кариотип 46,X,der(X) (Aller V. et al., 1995; Taga M. et al., 1996; Uehara S. et al., 1997; Blumenthal A. et al., 1997), а также у некоторых мозаиков 45,X/46,XX (Hirahara F. et al., 1995; Novak A. et al., 1995; Magee A. et al., 1998). В последнее время появляются сообщения о наступлении беременности и рождении здоровых детей у пациенток с этим синдромом с помощью вспомогательных репродуктивных технологий (Gutierrez A. et al., 1994; Khastgir G. et al., 1997; Bresson J. et al., 1997).

Частота носителей *сверхчисленных маркерных хромосом* в популяции составляет 1:1000. В структуре обращаемости на ПД носители таких кариотипов встречаются редко. Тем не менее, наличие *маркерных хромосом* увеличивает вероятность не только образования анеуплоидных гамет, но и *однородительской дисомии* у потомства по участкам, представленным в маркерной хромосоме (James R.S. et al., 1995).

Аномалии кариотипа являются фактором высокого риска рождения ребенка с хромосомным дисбалансом, обусловленным семейным носительством геномных и хромосомных мутаций. Анеуплоидия по половым хромосомам у родителей, представленная мозаичной или даже полной формой, может не сопровождаться нарушением репродуктивной функции. Многие носители структурных и численных аномалий кариотипа оказываются пациентами центров по бесплодию и вспомогательных репродуктивных технологий. В этих случаях ПД может быть осуществлена на стадии 10–12 бластомеров, т.е. до трансплантации эмбрионов в матку, или рекомендована в регламентированные сроки уже после наступления беременности.

10.1.5. Высокий риск рождения ребенка с хромосомной болезнью по результатам биохимического скрининга

С помощью биохимического скрининга удастся выявить 60–70% плодов с болезнью Дауна во II триместре, а в сочета-

нии с данными УЗИ в 11–12 нед. беременности (толщина воротникового пространства, длина носовой кости) – 95–98% (см. главы VII, VIII). Основные принципы пренатального скрининга для формирования групп риска по рождению ребенка с синдромом Дауна подробно рассмотрены в главе V. При определении порогового уровня (англ. cut off – глава VII) для инвазивной ПД следует исходить из расчета, что при массовом скрининге (охват не менее 80% всех беременных) группа риска, которой будет рекомендовано пренатальное карiotипирование, составит не менее 5% от всех обследованных. Немаловажным для определения порога является и риск послеоперационных осложнений, который не должен превышать риск рождения ребенка с болезнью Дауна. Отметим также, что болезнь Дауна у плода подтверждается только у 1 из 50 беременных с отклонениями маркерных сывороточных белков, что обусловлено высокой чувствительностью и низкой специфичностью биохимического скрининга (глава VII).

10.1.6. Пороки или отклонения развития, выявленные при ультразвуковом исследовании (ультразвуковые маркеры хромосомной патологии)

Особенно высок риск хромосомных аномалий у плода при наличии патологии, выявляемой при УЗ-обследовании. УЗ-маркеры и тяжелые пороки являются важнейшим показанием для карiotипирования плода. Вместе с тем, прогностическая значимость каждого из УЗМ различна и существенно зависит от срока беременности, типов аномалий развития и их сочетаний (см. главу VIII).

Некоторые пороки развития органов и систем и/или транзиторные состояния, не соответствующие сроку развития, чаще встречаются у плодов с определенными хромосомными болезнями (Снайдерс Р., Николаидес К., 1997; Медведев М.В., 2000). Однако строгой специфичности УЗ-маркеров и хромосомной патологии у плода вообще и, тем более, патогномичных для определенных хромосомных синдромов не выявлено. Синдромологический подход в УЗ-диагностике, равно как в клинической генетике и патологической анатомии, позволяет зарегистрировать аномалии развития и с той или иной вероятностью заподозрить наличие хромосомной патологии. Очевидно, что постановка диагноза хромосомной патологии у плода реально возможна только путем карiotипи-

пирования. Следует учитывать, что у многих плодов с хромосомным дисбалансом пороки развития отсутствуют, а фенотипические признаки столь невыразительны, что вполне могут оказаться не зарегистрированными даже в качестве УЗМ. Наконец, разграничение эхографических признаков на ВПР и УЗМ хромосомных болезней, учитывая транзиторный характер не только многих УЗМ, но и некоторых пороков развития, коррекция которых осуществляется за счет компенсаторных механизмов в процессе дальнейшего внутриутробного развития, также неубедительно. На наш взгляд, *термин «УЗМ хромосомных болезней» может быть использован применительно к любым отклонениям в развитии плода, независимо от степени их тяжести.* Исключениями из этого правила являются лишь некоторые, в основном изолированные, пороки развития (например, анэнцефалия или другие дефекты зародка нервной трубки), при которых хромосомные нарушения у плода являются случайными находками. Это утверждение отнюдь не противоречит факту существования пороков развития, включая МВПР, не только хромосомной, но и генной этиологии.

Проведение УЗ-скрининга в конце 14-й недели беременности, когда возможна точная диагностика пороков, выявленных или заподозренных в I триместре беременности, приводят к смещению сроков инвазивных вмешательств с целью пренатального кариотипирования во II триместр. Аналогичная тенденция прослеживается и в организации скрининга во II триместре. УЗИ, выполненное на 24-й неделе беременности, автоматически перемещает сроки инвазивных вмешательств в III триместр. Поэтому УЗ-скрининг, безусловно, эффективный для диагностики ВПР, следует проводить не позже 11–12-й недели в I триместре и на 20–22-й неделе беременности во II триместре.

В зависимости от возраста, наличия хромосомных перестроек, наличия в анамнезе ребенка с МВПР или с хромосомными болезнями, а также при выявлении биохимических и/или УЗ-маркеров хромосомных болезней беременная попадает в группу высокого риска хромосомной патологии у плода и незамедлительно подлежит направлению на инвазивную ПД. Принимая во внимание, что подавляющее большинство геномных мутаций возникают de novo, и, следовательно, каждую беременность можно рассматривать как потенциальную ситуацию риска рождения ре-

бенка с хромосомной болезнью, целесообразно проводить пренатальное кариотипирование во всех случаях получения плодного материала независимо от основной причины инвазивного вмешательства (моногенные болезни, резус-конфликт и др.).

В заключение следует подчеркнуть, что наличие ультразвуковых и/или биохимических маркеров в группах цитогенетического скрининга может только увеличивать уже имеющийся риск рождения ребенка с хромосомной патологией. В то же время, отсутствие дополнительных ультразвуковых и биохимических маркеров отнюдь не гарантирует наличие нормального кариотипа у плода и, таким образом, не снимает необходимость цитогенетического исследования плодного материала. Оптимальный алгоритм ПД должен включать все три варианта скрининга (биохимический, ультразвуковой и цитогенетический), *но при этом никак не подменять один другим.* Их соотношения по срокам беременности, объему обследований, равно как и учет возраста женщины, при котором следует рекомендовать кариотипирование плода вне зависимости от результатов ультразвукового и биохимического скринингов, могут варьировать и определяться уровнем организации службы ПД.

В нашем центре с мая 1987 г. по март 2005 г. было проанализировано в общей сложности 8000 пренатальных кариотипов (табл. 10.4). Из них 4356 (54%) относились к группе цитогенетического, 981 (12%) — биохимического и 808 (11%) — ультразвукового скрининга. В 1801 (23%) случаях кариотипирование было проведено в группах низкого риска хромосомных болезней у плода — сопутствовало диагностике моногенных болезней, предвещало лечение гемолитической болезни плода при Rh-конфликтной беременности или было проведено по желанию родителей, обеспокоенных состоянием или полом плода. Частота хромосомных болезней в этих группах составила 3,9; 1,7; 17,6 и 0,6% соответственно.

10.2. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПД

В настоящее время проблема цитогенетической ПД на любом сроке беременности практически решена. Разработаны надежные и эффективные методы хромосомного анализа клеток плода и зародышевых оболочек.

В зависимости от срока беременности и задач исследования материалом для хромосомного анализа могут служить хо-

Таблица 10.4

Показания к пренатальному кариотипированию и частота хромосомных болезней у плодов в разных группах риска (результаты цитогенетической ПД в ГУ НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН, Санкт-Петербург, май 1987 – март 2005)

| Тип пренатального скрининга | Показание | Численность группы | Выявлено хромосомных болезней | |
|-----------------------------|--|--------------------|-------------------------------|---------------------|
| | | | Абсолютное число | % от числа в группе |
| Биохимический | Биохимические маркеры синдрома Дауна у плода, риск >0,5% | 981 | 17 | 1,7 |
| Ультразвуковой | УЗМ хромосомных болезней у плода | 862 | 152 | 17,6 |
| Цитогенетический | | 4356 | 172 | 3,9 |
| В том числе | Возраст беременной 35 лет и старше | 3516 | 141 | 4,0 |
| | Ребенок (плод) с хромосомной болезнью в анамнезе | 505 | 13 | 2,6 |
| | Ребенок (плод) с МВНР в анамнезе | 182 | 4 | 2,2 |
| | Аномальный кариотип у одного из супругов | 153 | 14 | 9,2 |
| Прочие | Моногенные болезни, озабоченность состоянием плода и др. | 1801 | 11 | 0,6 |

рион и плацента, клетки амниотической жидкости и лимфоциты пуповинной крови плода, полученные соответствующими инвазивными способами (см. главу IX). *Все эти клетки – производные различных эмбриональных и экстраэмбриональных структур – возникают из одной зиготы (глава II), поэтому имеют одинаковый генотип.*

Получение информации о кариотипе плода на различных стадиях внутриутробного развития требует применения комплекса цитогенетических методов, который включает разнообразные способы приготовления и окрашивания препаратов хромосом. Преимущества и недостатки цитогенетического анализа при использовании разных методов получения хро-

мосомных препаратов из образцов плодного материала обобщены в таблице 10.5. *Следует подчеркнуть, что эффективность цитогенетической диагностики зависит от качества и количества плодного материала, а ее точность определяется разрешающей способностью методов хромосомного анализа, выбор которых диктуется показаниями к ПД и сроком беременности. Перед проведением инвазивного вмешательства необходимо оценить адекватность получаемого плодного материала конкретным целям диагностики.*

10.2.1. Особенности цитогенетического анализа клеток различного плодного происхождения

10.2.1.1. Клетки ворсин хориона (плаценты)

Первые попытки получения образцов хориона в I триместре беременности с применением эндоскопической техники были предприняты в 60–70-е годы XX века и проводились перед медицинским абортom (см. главу IX). Первые массовые исследования хориона для определения пола плода по половому хроматину были осуществлены в Китае (Anshan, 1975). Однако значительное число послеоперационных осложнений и проблемы, связанные с получением хромосомных препаратов, сдерживали внедрение хорионбиопсии в целях пренатального кариотипирования (Hahnemann N., 1974; Goldberg M.F. et al., 1980). Повторный интерес к хорионбиопсии был стимулирован совершенствованием инструментальных методов и ультразвуковых приборов, а также разработкой новых подходов к ПД наследственных болезней.

Независимо от способа получения ворсин хориона образец должен быть тщательно проанализирован при помощи лупы или инвертированного микроскопа с целью отбора ворсин и их фрагментов, а также визуальной оценки количества биоптата хориона или плаценты. Морфологический контроль имеет особенно большое значение, если для дальнейшего анализа предполагается использование молекулярно-генетических методов или культивирования. Строгие критерии отбора ворсин снижают вероятность контаминации, но не столь существенны при приготовлении препаратов, ориентированных на спонтанную митотическую активность («прямые» методы – см. ниже).

Клетки ворсинчатого хориона (плаценты), доступные для цитогенетической ПД, имеют различное происхождение:

Характеристика методов получения препаратов хромосом для стандартного кариотипирования плода

| Метод | Преимущества | Недостатки | Результативность |
|---|--|---|---|
| Культивирование клеток амниотической жидкости и клеток хориона или плаценты | Высокое качество хромосомных препаратов: • достаточное количество метафазных пластинок • возможность дифференциального окрашивания хромосом различными методами | <ul style="list-style-type: none"> • Контаминация культур материнскими клетками • Длительность культивирования (1,5–3 нед.) • Опасность инфицирования культуры • Дорогостоящие реактивы, оборудование и расходные материалы • Вес образца хориона не менее 15 мг | 99% (~70%)* |
| Варианты «прямого» метода анализа клеток хориона или плаценты | <ul style="list-style-type: none"> • Скорость (1–2 дня) • Возможность анализа образца небольшого объема • Возможность анализа с 9,5 до 20 нед. беременности • Отсутствие контаминации материнскими клетками • Экономичность | <ul style="list-style-type: none"> • Низкий митотический индекс • Недоступность некоторых методов дифференциальной окраски хромосом | 96–99% (99,8% – I триместр; 99,6% – II триместр)* |
| Культивирование лимфоцитов пуповинной крови | <ul style="list-style-type: none"> • Относительная скорость (2–4 дня) • Высокое качество хромосомных препаратов: – достаточное количество метафазных пластинок – возможность дифференциального окрашивания хромосом различными методами | <ul style="list-style-type: none"> • Контаминация культур материнскими клетками • Материал доступен с 18-й недели беременности | >99% (99,9%)* |

* По нашим данным

- клетки цитотрофобласта (дифференцируются на стадии морулы);
- клетки мезенхимы (дифференцируются на стадии бластоцисты).

Для хромосомного анализа по клеткам хориона или плаценты используют два основных подхода:

1. **Длительное культивирование.** Способность клеток ворсинчатого хориона к пролиферации в условиях культуры сделала их привлекательными для ПД хромосомных болезней. Однако вопрос о происхождении клеток, образующих клоны, долгое время оставался открытым. В настоящее время установлено, что клетки, делящиеся *in vitro* в условиях перевиваемых культур хориона, представляют собой фибробласты мезенхимной стромы ворсины (Niazi M. et al., 1981). Образование колоний или рыхлого монослоя происходит обычно к 10–12-му дню культивирования. Основными недостатками метода являются длительность культивирования и контаминация культур материнскими клетками. Существует множество модификаций культивирования ворсин хориона. Подробнее ознакомиться с ними можно в соответствующей литературе (Золотухина Т.В., Кухаренко В.И., 1990; Simoni G. et al., 1983; Roberts E. et al., 1988; Verma R.S., Babu A., 1989).

2. **«Прямые» препараты.** Метод анализа «прямых» препаратов основан на исследовании спонтанно делящихся клеток цитотрофобласта без их предварительного культивирования в сроки от 10 до 20 нед. беременности. Впервые препараты из ворсинчатой ткани хориона, содержащие метафазные пластинки удовлетворительного качества без использования культуры клеток, были получены группой миланских исследователей (Simoni G. et al., 1983). В последующие годы были предложены различные модификации метода, которые затрагивают все этапы обработки ворсин. По существу все варианты метода можно подразделить на две группы:

- собственно «прямой» — кратковременная (2–3 ч) преинкубация нативных ворсин перед гипотонической обработкой и фиксацией (Simoni G. et al., 1986; Vekmans M.J.J., Perry T.B., 1986; Tetzoli G.I. et al., 1987);
- «полупрямой» — увеличение времени инкубации нативных ворсин в культуральной среде с питательными добавками до 24, 48 или 72 ч (Simoni G. et al., 1986; Metaxotani A. et al., 1987).

Типичными недостатками прямого метода являются малое число метафазных пластинок, артефактная утрата хромосом при мацерации ткани в уксусной кислоте и малая пригодность хромосом для стандартной дифференциальной окраски красителем Гимза (метод GTG). Подсчет числа митозов на прямых и полупрямых препаратах показал, что при инкубации ворсин в течение 2–3 сут. митотическая активность клеток цитотрофобласта выше, чем при 2- или 24-часовой инкубации (Simoni G. et al., 1986). Предполагается, что в момент биопсии клетки испытывают «шок», при котором нарушаются параметры клеточного цикла, и клетки не вступают в митоз (Kennerknecht I. et al., 1991).

Разработанный нами ускоренный прямой метод (Баранов В.С., 1989; Баранов В.С. и др., 1990а, б) предполагает применение больших доз колхицина с одновременной обработкой в гипотоническом растворе. Ранее было показано, что проникновение колхицина через хорион-аллантаидную плаценту затруднено вследствие защитных функций синцитиотрофобласта (Дыбан А.П., Баранов В.С., 1978). Возможно, увеличение дозы колхицина и применение гипотонической обработки сразу после получения образца способствуют преодолению плацентарного барьера и препятствуют развитию клеточного шока. Существенным является и размягчение образца непосредственно на препарате, что минимизирует потери материала. Применение мягкой фиксации и последующая гидратация фиксированного материала благоприятно сказываются на морфологии хромосом и позволяют применять любые методы дифференциальной окраски, включая метод FISH. Следует подчеркнуть, что эта модификация пригодна для приготовления препаратов хромосом из тканей с высокой естественной митотической активностью, включая любые эмбриональные ткани и органы. Интерфазные ядра, обработанные таким способом, вполне пригодны для FISH-анализа со специфическими ДНК-зондами, что важно при верификации цитогенетического пренатального диагноза. Детально методики приготовления препаратов и вариантов дифференциальной окраски описаны нами ранее (Баранов В.С. и др., 1995; Кузнецова Т.В. и др., 1999).

Необходимо признать, что число митозов на прямых препаратах из хориона и, особенно, из плаценты существенно ниже, чем на препаратах из культур клеток. Известно, что

пролиферация клеток цитотрофобласта варьирует в зависимости от срока беременности, что, очевидно, связано с особенностями функций хориона и плаценты. С начала II триместра до конца беременности митотическая активность клеток цитотрофобласта постепенно снижается (Tedde G., Tedde P., 1978), что сопровождается постепенным истощением цитотрофобластического слоя (Calton M., 1962). Предпринятое нами специальное исследование митотической активности клеток цитотрофобласта на «прямых» препаратах хориона и плаценты разных сроков развития (Лапина Е.А., Кузнецова Т.В., 2000) показало, что, несмотря на заметные индивидуальные различия, митотический индекс в I триместре в 2 раза превышает таковой во II триместре и на порядок – в III триместре беременности (рис. 10.2). Активная пролиферация цитотрофобласта в конце первого триместра (10–12 нед. беременности) сопровождается интенсивным синтезом β -ХГЧ (Kleim M. et al., 1995). При повышенном уровне ХГЧ в сыворотке крови матери во II триместре также наблюдается относительно высокий уровень митотических делений клеток цитотрофобласта плаценты (Лапина Е.А., Кузнецова Т.В., 2000). Таким образом, *число метафазных пластинок на «прямых» препаратах из плаценты коррелирует не только со сроком беременности, но и с уровнем сывороточного ХГЧ.*

Ускоренный прямой метод приготовления препаратов из хориона и плаценты используется в нашем центре как основной для пренатальной диагностики хромосомных болезней в сроки 9,5–19 нед. беременности. В сочетании с флуоресцентными методами дифференциальной окраски хромосом (QFH) его результативность на более чем 7500 образцах превысила 99,5%. Применение систем для анализа изображений («ВидеоТестКарио», «Leica») с программным обеспечением для кариотипирования в интерактивном режиме существенно повышает скорость, надежность и эффективность анализа.

Высокая эффективность, быстрота и надежность при минимальной себестоимости обеспечили быстрое внедрение этих модификаций в различных пренатальных диагностических центрах России и стран ближнего зарубежья.

10.2.1.2. Клетки амниотической жидкости

Клетки амниотической жидкости (КАЖ) имеют различное происхождение и представлены несколькими типами:

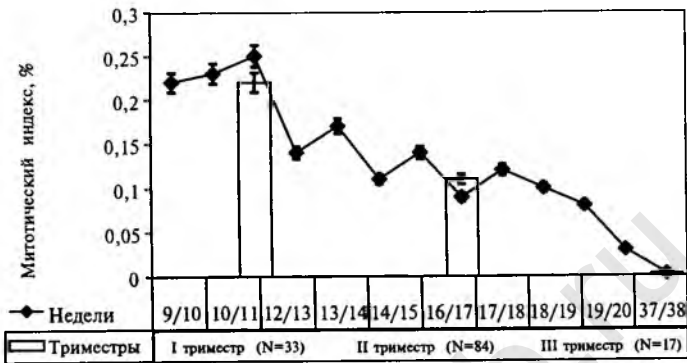


Рис. 10.2. Динамика пролиферативной активности цитотрофобласта на протяжении беременности. Для вычисления митотического индекса использована стандартная формула $m=N_m/N$, где N_m — число митозов, а N — общее число клеток в исследованной совокупности. Митотический индекс в I и II триместрах беременности оценивали на диагностических препаратах из ворсин хориона или плаценты, в III триместре из биоптатов последа после родоразрешения путем операции кесарева сечения. Хромосомные препараты из всех образцов приготовлены ускоренным «прямым» методом с использованием колхицина. Подсчет клеток проведен на 2 препаратах из каждого образца. Под митозами (N_m) понимали число метафазных пластинок. Общее число клеток на образец (N) составило 10 000 (по 5000 клеток на каждый препарат).

- клетки амниотической оболочки, или собственно амниоциты, производные первичной эктодермы (см. главу II);
- слущенные эпителиальные клетки плода (эпидермиса, пищеварительного тракта, мочеполовых и дыхательных путей, слизистой ротовой полости).

Некоторые КАЖ способны к пролиферации и образованию колоний *in vitro* (Steele M.W., Breg W.R., 1966), при этом специфическими для такой культуры являются амниоциты. Количественный и качественный состав КАЖ, а также концентрация жизнеспособных клеток обнаруживают индивидуальную вариабельность и зависят от срока беременности. Наиболее часто для культивирования используют амниотические клетки, полученные в срок 15–18 нед. беременности.

Использование для этих целей амниоцитов в более ранние (12–14 нед.) или более поздние (после 20 нед.) сроки принципиально возможно, но, как правило, осложняет и удлиняет процесс диагностики.

Стандартное культивирование КАЖ с момента получения образца АЖ до кариотипирования занимает 14–21 день и включает следующие этапы: постановку культуры, субкультивирование, гипотоническую обработку и фиксацию. Несмотря на широкое использование КАЖ в ПД, единой методики для культивирования и получения хромосомных препаратов не существует. Наиболее распространенные варианты получения культур КАЖ описаны в соответствующих методических руководствах (Кузнецова Т.В. и др., 1999; Назаренко С.А., Васильева Е.О., 2003).

Для приготовления препаратов из КАЖ и последующего цитогенетического анализа используют два основных подхода (Carrega J.M., Di Renzo G.C., 1993):

1. **Flask-метод** — культивирование клеток во флаконах и фиксация суспензии монослойной культуры после трипсинизации. Анализ проводят в двух из трех культур (по 10 метафаз для каждого образца). Если во всех метафазах наблюдается одинаковый кариотип, диагноз считается установленным. В случае обнаружения единичной метафазы с aberrантным кариотипом (числовым или структурным) анализируется резервная третья культура. Если одна и та же хромосомная aberrация определяется в более чем одной метафазе из одного флакона, но не подтверждается в остальных флаконах, устанавливается диагноз «псевдомозаицизм». Обнаружение одной и той же хромосомной аномалии в более чем одном флаконе свидетельствует о реально существующем мозаицизме.

2. **Метод *in situ*** — культивирование и фиксация клеток на покровных стеклах в чашках Петри или в специальных флаконах-слайдах. Анализ проводят на метафазных пластинках из 10 колоний, полученных в трех культуральных чашках или флаконах. При выявлении аномального клона анализируют все культуры. Хромосомная аномалия, найденная лишь в одном культуральном флаконе/чашке, свидетельствует о «псевдомозаицизме», в двух и более — о **мозаицизме**.

В последние годы разработан принципиально новый подход к анализу хромосом из культивированных клеток. **Метод «pipett»** основан на изоляции с помощью иглы микроманипу-

лятора метафазных и прометафазных клеток, имеющих характерную морфологию и ослабленную связь с субстратом (Claussen U. et al., 1986; 1993; Рубцов Н.Б. и др., 1994). Дальнейшая гипотоническая обработка и фиксация проводятся с единичными клетками. Этот способ позволяет сократить период культивирования до нескольких дней и, что особенно существенно, снизить риск диагностических ошибок, обусловленных как мозаицизмом, так и контаминацией образца. Получение прометафазных и метафазных пластинок таким способом возможно из любых несуспензионных – первичных и перевиваемых культур (Рубцов Н.Б., 1996). К сожалению, дорогостоящее оборудование и трудоемкость препятствуют широкому внедрению этого прогрессивного метода в клиническую практику.

Неудачи кариотипирования по КАЖ во многом обусловлены качеством реактивов (питательные среды, сыворотки, стимуляторы роста клеток) и недостатком опыта работы по культивированию вьлорастущих клеток (Золотухина Т.В., Кухаренко В.И., 1990). К недостаткам можно отнести высокую стоимость питательных сред и оборудования, что немаловажно для отечественных лабораторий. Следует также отметить, что при кариотипировании с использованием культур КАЖ, особенно в случае беременности плодом женского пола, невозможно установить число ошибочных диагнозов, обусловленных контаминацией материнскими клетками.

Препараты некультивированных КАЖ используются в настоящее время для экспресс-диагностики наиболее частых анеуплоидий методом FISH и методом количественной флуоресцентной полимеразной цепной реакции (Quantitative Fluorescent PCR – QF-PCR – см. главу XV). Эти подходы также могут быть использованы для получения детальной информации о хромосомном статусе плода при верификации геномных мутаций, установленных по клеткам другого происхождения (хорион/плацента, лимфоциты пуповинной крови).

10.2.1.3. Лимфоциты пуповинной крови плода

После разработки методики пункции пуповины (кордоцентеза) (см. главу IX) проблема получения крови плода была практически решена. В диагностических целях кордоцентез выполняют начиная с 18–19-й недели беременности

(Ludomirsky A. et al., 1987; Butler M. et al., 1988; Кузнецов М.И. и др., 1994).

При использовании для кариотипирования пуповинной крови плода применяют стандартную методику культивирования лимфоцитов, стимулированных к делению с помощью митогенов (например, фитогемагглютинина – ФГА).

Лимфоциты пуповинной крови, имеющие исключительно плодное происхождение, дают наиболее адекватное представление о хромосомном статусе плода. Поэтому кордоцентез предпочтительнее амниоцентеза в случаях уточнения кариотипа плода при обнаружении хромосомного мозаицизма в плаценте.

Одной из проблем пренатальной цитогенетической диагностики по лимфоцитам плода является контаминация образца пуповинной крови околоплодными водами и материнской кровью. КАЖ, которые не способны к пролиферации в суспензионной культуре, а также незначительный объем амниотической жидкости в образце пуповинной крови не влияют на процесс культивирования лимфоцитов. Однако по мере снижения концентрации клеток крови и увеличения объема амниотической жидкости в полученном образце возрастает риск культуральных неудач. Источником серьезных диагностических ошибок может быть примесь материнской крови. Контроль за чистотой образца проводится в соответствии с методиками, основанными на отличиях фетального гемоглобина от гемоглобина взрослых эритроцитов (Золотницкая Р.П., 1987; Odur G. et al., 1996).

Использованные нами варианты культивирования лимфоцитов пуповинной крови (Баранов В.С. и др., 1995; Кузнецова Т.В. и др., 1999) позволили провести успешную цитогенетическую диагностику в 99,8% случаев. Единичные неудачи при культивировании были обусловлены гемолизом эритроцитов, полученных от плодов с тяжелой формой гемолитической болезни.

10.2.2. Краткая характеристика методов окраски хромосомных препаратов

В зависимости от задач исследования препараты хромосом можно анализировать одним из следующих способов.

1. *Анализ с помощью фазового контраста* позволяет оценить митотический индекс и качество метафазных пластинок на неокрашенном препарате.

2. *Сплошное, или равномерное окрашивание хромосом (рутинная окраска)* позволяет произвести подсчет хромосом на метафазной пластинке, а также их идентификацию по группам. Этот метод непригоден для целей кариотипирования. Ограниченные возможности метода сузили область его применения в современной цитогенетике до анализа и учета некоторых типов хромосомных aberrаций (хромосомные и хроматидные разрывы, кольца, фрагменты) при исследованиях мутагенной активности факторов среды.

3. *Дифференциальное окрашивание хромосом* дает наиболее полное представление о кариотипе. Методы дифференциального окрашивания позволяют идентифицировать любую хромосому набора по специфичному для каждой гомологичной пары рисунку в соответствии с основными типами линейной исчерченности Q-, G- и R-. Для каждого из видов окраски и ее детекции разработаны многочисленные модификации технического выполнения этапов, поэтому была принята трехбуквенная система обозначения вида окраски, включающая собственно тип исчерченности, вариант предобработки и название красителя. Основные типы окраски, наиболее широко используемые в цитогенетической практике: GTG, QFQ и реже — QFH, RHG, RBA, FPG. Последние два типа окраски основаны на асинхронной репликации сегментов хромосом и используются, в основном, для получения R-рисунка с высоким уровнем разрешения.

По сложившимся традициям большинство врачей-цитогенетиков предпочитают световые варианты окрашивания, люминесцентные методы в практической работе ограничены анализом Y-хроматина. Как показывает наш опыт, использование нуклеотид-специфичных флуорохромов в сочетании с контрастирующими агентами не только существенно повышает разрешающую способность и эффективность цитогенетического анализа, но и позволяет получать более стабильные и воспроизводимые результаты дифференциальной окраски, что имеет принципиальное значение для ПД.

4. *Избирательные (селективные) окраски* направлены на выявление отдельных сегментов хромосом. В частности, для анализа прицентромерных гетерохроматиновых районов (С-сегментов) всех хромосом широкое распространение получил метод СВГ. С целью селективного окрашивания полиморфных С-блоков (хромосомы 1, 9, 15, 16, 22 и Y) целесооб-

разно использовать флуорохромы DAPI или Hoechst 33258 с предварительным контрастированием хромосом дистамицином А или метиловым зеленым. Выявление активных ядрышкообразующих районов осуществляют с помощью раствора азотнокислого серебра (Ag-ЯОР, или Ag-NOR способ окрашивания).

5. *Гибридизация in situ* является одним из современных методов молекулярно-цитогенетического анализа. Суть метода заключается в использовании хромосом-специфических ДНК-зондов, их гибридизации на хромосомных препаратах и детекции сигнала с помощью светового или люминесцентного микроскопа. Метод FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization — флуоресцентный неизотопный вариант гибридизации) позволяет идентифицировать структурные хромосомные перестройки, устанавливать природу маркерных хромосом, проводить анализ численных нарушений хромосомного набора на метафазных пластинках и в интерфазных ядрах. Комбинация различно модифицированных ДНК-зондов, выявляемых с помощью разных систем детекции, позволяет одновременно определять местоположение двух и более последовательностей ДНК в одной клетке или на одной метафазной пластинке. Эти преимущества позволяют использовать метод FISH для анализа хромосом в единичных бластомерах при доимплантационной диагностике, а также при невысокой митотической активности и качестве метафазных хромосом на препарате из любых тканей. К недостаткам, которые не позволяют рассматривать его как диагностический метод в ПД, следует отнести вероятность получения неоднозначных результатов. В частности, отсутствие гибридизационного сигнала в интерфазном ядре может быть обусловлено как отсутствием соответствующего сайта ДНК на хромосомном препарате (т.е. моносомии), так и неэффективным связыванием с ним меченого ДНК-зонда, а обнаружение дополнительных сигналов — как присутствием сайтов (т.е. трисомии), так и фоновым свечением. Проблемы диагностики мозаицизма частично могут быть разрешены при сопоставлении результатов данных FISH с результатами традиционного исследования метафазных хромосом, а также данными молекулярно-генетического анализа.

Детальное описание основных методов дифференциальной окраски хромосом и метода гибридизации *in situ* приведе-

но в соответствующей литературе (Захаров А.Ф. и др., 1982; Баранов В.С. и др., 1995; Кузнецова Т.В. и др., 1999; Рубцов Н.Б. и др., 2005; Verma R.S., Babu A., 1989).

10.2.3. Основные принципы цитогенетического анализа в ПД

При пренатальном кариотипировании следует руководствоваться рекомендациями, принятыми в отечественной и международной клинической цитогенетике, а также нормативными документами Министерства здравоохранения РФ (Кулешов Н.П., 1991; Приказ МЗ РФ №316 от 30.12.1993 г.; Knutsen T. et al., 1990; EUCROMIC, 1998). Заключение о кариотипе должно соответствовать правилам Международной номенклатуры хромосом (ISCN, 1995). В связи с увеличением числа центров, в которых проводится ПД, представляется целесообразным рассмотреть основные требования к организации работы цитогенетических подразделений таких центров и к качеству пренатального кариотипирования. Основные разделы программы контроля качества цитогенетических исследований в учреждениях медико-генетической службы включают состав и квалификацию персонала, оборудование и реактивы, а также ряд параметров, касающихся непосредственного выполнения хромосомного анализа (подробнее см.: Назаренко С.А., Васильева Е.О., 2003).

Состав и квалификация персонала

Согласно нормативам (Приказ МЗ РФ №316 от 30.12.1993 г.), цитогенетическая пренатальная диагностика осуществляется коллективом, состоящим из специалистов с высшим и средним специальным образованием. При этом штатная структура цитогенетического подразделения должна иметь не менее 2 ставок врачей-цитогенетиков и соответствующее им число ставок фельдшеров-лаборантов. При этом каждый врач-цитогенетик должен выполнить 160 пренатальных кариотипов в год.

Оборудование

Необходимым условием точности проводимых исследований является соответствующее им лабораторное оборудование, контроль и сертификация которого осуществляются по определенной схеме.

Реактивы

Для контроля качества реактивов разработаны унифицированные процедуры. Индивидуальные протоколы процедур тестирования должны сопровождаться специфическими инструкциями по всем этапам исследования. Следует особо подчеркнуть, что необходимо заблаговременно проверять качество реактивов, используемых для приготовления рабочих растворов. Во избежание повторных технических ошибок рекомендуется учитывать и анализировать их характер и частоту в режиме лабораторной базы ошибок.

Показатели качества цитогенетических исследований

Число анализируемых метафаз. Для препаратов из культур клеток достаточным считается наличие 20–50 метафазных пластинок на предметное стекло. Качество «прямых» препаратов из цитотрофобласта хориона или плаценты, как отмечалось выше, можно считать удовлетворительным, если на стекле присутствует более 10 метафаз, пригодных для подсчета и анализа структуры хромосом. При этом независимо от способа приготовления препаратов разброс хромосом признается хорошим, если наложения хромосом отсутствуют или представлены небольшим числом (1–2) в более 80% пластинок и плохим, если многочисленные наложения хромосом встречаются более чем в 20% метафаз.

Качество окраски. Система оценки уровня разрешения и качества учитывает как число сегментов на гаплоидный набор хромосом, так и возможность идентификации отдельных G^+ -сегментов. Для ориентировочной оценки уровня разрешения рекомендуется произвести подсчет числа G -сегментов в хромосомах 1 и 2 с умножением полученной суммы на 6. Качество окраски признается хорошим, если ее четкость при уровне разрешения ~550 сегментов позволяет идентифицировать 4 G^+ -сегмента на 18q и 3 – на 11p, 7q33 и 7q35, особенно, если удастся визуализировать сегмент 22q13.2. Такой уровень (400–550 сегментов на гаплоидный набор) достаточен для стандартного кариотипирования. Для анализа микроперестроек хромосом требуется более высокое разрешение (>800 сегментов), которое достигается при использовании репликационных вариантов дифференциального окрашивания.

Время анализа. Сроки проведения анализа имеют в ПД принципиальное значение. Промежуток времени от момента получения плодного материала до постановки цитогенетического диагноза зависят от методических особенностей выполняемого исследования, пропускной способности лаборатории, диагностической сложности конкретного случая, необходимости уточняющих лабораторных мероприятий и т.д. Оптимальным для кариотипирования по клеткам ворсин хориона является срок 3–7 дней, клеток амниотической жидкости – 10–16 дней, лимфоцитов пуповинной крови – 4–7 дней. Большую часть времени составляет этап культивирования, тогда как собственно анализ хромосомных препаратов в стандартном режиме занимает 1–1,5 рабочих дня. Однако реальные сроки цитогенетической диагностики могут варьировать в широком диапазоне. Так, высокотехнологичный и продуктивный метод FISH позволяет проводить анализ по интерфазным ядрам на препаратах некультивированных клеток за 1–2 дня. Этот метод широко используется за рубежом для экспресс-диагностики наиболее распространенных анеуплоидий. Разработанный нами ускоренный прямой метод приготовления препаратов из цитотрофобласта позволяет провести традиционный анализ окрашенных флуорохромом Noechst 33258 хромосом и при необходимости выдать заключение о кариотипе в день получения материала. Увеличение времени анализа обусловлено либо техническими, либо диагностическими проблемами. К техническим проблемам можно отнести низкий митотический индекс и неудовлетворительное качество метафазных пластинок, что требует просмотра всех полученных препаратов. Диагностическим проблемам и способам их решения посвящен специальный раздел этой главы. Отметим только, что сложные случаи требуют не только применения дополнительных методик для уточнения первичного цитогенетического заключения, но и кариотипирования родителей, что задерживает постановку цитогенетического диагноза как минимум на неделю. Возможные неудачи при цитогенетическом исследовании обусловлены, как правило, отсутствием метафазных пластинок, пригодных для анализа. Средние стандарты технических (неполучение результата при наличии жизнеспособных клеток) и культуральных (отсутствие адекватного роста клеток) неудач при кариотипировании по клеткам амниотической жидкости и хориона

составляют 1,5 и 2% соответственно, а по лимфоцитам периферической крови — 5% (Назаренко С.А., Васильева Е.О., 2003). Накопленный нами опыт (более 8000 пренатальных диагностик) показывает, что результативность анализа по клеткам цитотрофобласта на «прямых» препаратах из хориона и плаценты, а также по ФГА-стимулированным лимфоцитам пуповинной крови оказывается выше (в среднем 99,8%) (Кузнецова Т.В., 2000). Причины невозможности проведения цитогенетического анализа в 0,2–0,4% случаев были рассмотрены нами в соответствующих разделах (10.2.1). Вместе с тем, отсутствие или недостаточное число метафаз на «прямых» препаратах далеко не всегда связано с нехваткой материала, полученного при хорион- или плацентобиопсии. Однако вес образца должен составлять >10 мг для ускоренного метода и >15 мг для кратковременных культур, а в случае совмещения прямых методов с культивированием клеток в монослое — >30 мг.

Правила кариотипирования. Заключение о кариотипе должно базироваться на идентификации и анализе структуры всех хромосом на 2–3 метафазных пластинках. Для заключения о кариотипе минимальное число пластинок должно составлять 11–15. Такой объем исследования позволяет исключить хромосомный мозаицизм с вероятностью более 95%. Мозаичная форма геномных мутаций устанавливается при наличии не менее 2 клеток с однотипным изменением кариотипа, что требует увеличения размера анализируемой выборки (подробнее о статистических проблемах диагностики мозаицизма см.: Фогель Ф., Мотульски А., 1989).

Особенности получения информации о кариотипе плода при использовании различных методик, обусловленных спецификой исследуемого материала, описаны в разделе 10.2.1.

Следует отметить, что системы анализа изображений с программным обеспечением для кариотипирования целесообразно использовать в интерактивном режиме. Ни одна из существующих в настоящее время программ для автоматического кариотипирования не является совершенной, и любая предложенная в автоматическом режиме кариограмма нуждается в проверке. Разница между программами состоит только в числе ошибок в кариограмме, полученной при автоматической раскладке идеальных метафазных пластинок с хорошим разбросом и отличной G-окраской хромосом. Как правило,

требуется коррекция 2–5 ошибок и более, вызванных неправильным распознаванием имиджа гомологичных и негомологичных хромосом и неадекватным размещением их в ячейках раскладки. Следует напомнить, что *под кариотипом человека понимают совокупность морфологических особенностей полного хромосомного набора единичной соматической клетки (Проккофьева-Бельговская А.А., 1969; ISCN, 1995)*. Поэтому *в кариограмме, которая является систематизированной характеристикой кариотипа, должны быть представлены гомологичные хромосомы, идентифицированные на одной метафазной пластинке*. Недопустимо использовать при составлении кариограммы хромосомы, принадлежащие разным наборам, т.е. из разных клеток.

Формулировка цитогенетического диагноза. Цитогенетический диагноз должен быть сформулирован в точном соответствии с рекомендациями Международной системы цитогенетической номенклатуры хромосом (ISCN, 1995). С основными правилами международной цитогенетической номенклатуры, переведенными на русский язык, можно ознакомиться в изданиях отечественных авторов (Ворсанова С.Г. и др., 1999; Назаренко С.А., Яковлева Ю.С., 2001). В любых случаях нестандартного кариотипа цитогенетическую формулу целесообразно сопровождать развернутым заключением, в котором интерпретируется цитогенетический диагноз, а также поясняются указанные в формуле особенности хромосомного набора.

В заключение следует отметить, что *при стандартном кариотипировании исключается носительство всех геномных мутаций (анеуплоидий и полиплоидий) и робертсоновских транслокаций, а также многих рецiproкных транслокаций и некоторых инверсий, особенно если они изменяют морфологию хромосом, вовлеченных в перестройку*. *Возможность точной идентификации хромосомных aberrаций зависит от разрешающей способности использованного метода дифференциальной окраски и в целом ряде случаев представляет значительные трудности*. Принимая также во внимание статистические проблемы диагностики хромосомного мозаицизма даже в пределах одной ткани, важно подчеркнуть, что *стандартное пренатальное кариотипирование позволяет исключить хромосомные болезни с вероятностью >99%, что, к сожалению, недостаточно для абсолютной гарантии рождения здорового ребенка*.

10.3. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ КАРИОТИПИРОВАНИЯ ПЛОДА

Трудности при ПД могут представлять как геномные, так и хромосомные мутации, некорректная интерпретация которых может привести к диагностическим ошибкам. *Сложными для цитогенетического анализа и требующими уточнения являются многие наследуемые aberrации хромосом, все случаи структурных перестроек, возникшие de novo, неидентифицированные сверхчисленные маркерные хромосомы, мозаицизм хромосом и однородительская дисомия (ОРД).*

Учитывая различную диагностическую и прогностическую значимость выявленных изменений кариотипа, а также разрешающую способность уточняющих диагностических мероприятий, рассмотрим более подробно каждую из этих проблем, а также оптимальные варианты их решения.

10.3.1. Мозаицизм хромосом

Термин «мозаицизм хромосом» обычно употребляется для обозначения сочетания в одном образце клеточных линий с различным хромосомным набором, выявленных при цитогенетическом анализе. Следует подчеркнуть, что генетическими мозаиками являются только те особи, которые возникли из одной зиготы, и, соответственно, наличие двух или более популяций клеток с различным генотипом в одном организме обусловлено соматическими мутациями, произошедшими в процессе развития.

По своему генезу хромосомный мозаицизм подразделяется на митотический и мейотический. *Митотический мозаицизм* возникает вследствие нерасхождения хромосом при дроблении нормальной диплоидной зиготы и сопровождается образованием клона трисомных клеток с удвоенной материнской или отцовской хромосомой и клона клеток с моносомией. При этом все моносомные клетки, за исключением 45,X, нежизнеспособны и быстро элиминируются. *Мейотический мозаицизм* возникает вследствие утраты лишней хромосомы из трисомной зиготы, возникшей вследствие ошибочной сегрегации хромосом в мейозе. При этом формируется диплоидный клон клеток и сохраняется клон клеток с трисомией. При дроблении полиплоидной зиготы сходным образом возникают мозаичные варианты триплоидии. Размеры аномального клона клеток и его локализация в тканях зависят от ста-

дии эмбриогенеза, на которой произошла мутация, а также жизнеспособности и пролиферативных потенций клеток с аномальным кариотипом (подробнее см. обзор: Кузнецова Т.В. и др., 2002).

Кариотипически различающиеся клетки могут быть представлены во всех тканях и органах (так называемый *истинный, или генерализованный мозаицизм*), или в какой-либо одной ткани или органе (*ограниченный мозаицизм*). Очевидно, что для полного представления о хромосомном статусе организма необходимо исследование клеток тканей разного зародышевого происхождения.

Особое внимание, которое уделяется мозаицизму в ПД, связано с тем, что в отличие от полных форм хромосомного дисбаланса многие мозаичные трисомии оказываются совместимыми с развитием и живорождением. При этом тяжесть клинических проявлений, в том числе и в пренатальном периоде, не обнаруживает прямой корреляции с представительностью аномальной клеточной линии в тканях, доступных для исследования.

Наличие на хромосомных препаратах кариотипически различающихся клеток не всегда отражает реальный мозаичный кариотип индивида, т.е. оказывается артефактным. Наиболее наглядным примером артефактного мозаицизма является моносомия, возникающая вследствие утраты хромосом в процессе приготовления препаратов. К разряду артефактов можно отнести и *псевдомозаицизм*, обусловленный спорадическим нерасхождением хромосом в одной клетке и ее способностью к клонообразованию в условиях *in vitro*. Реальный мозаицизм необходимо отличать от *химеризма*. Напомним, что *химера* — это особь, развивающаяся из разных зигот после их слияния. Обнаружение межклеточных различий по хромосомным наборам может быть также следствием контаминации исследуемого плодного образца клетками материнского происхождения.

Принципиальное значение для интерпретации результатов ПД имеют особенности происхождения материала для исследования, а также методы приготовления хромосомных препаратов. Напомним, что цитотрофобласт хориона, будучи производным трофобласта, а также мезодермальная строма ворсин хориона обособляются от внутренней клеточной массы на стадии бластоцисты, т.е. имеют экстраэмбриональ-

ное происхождение (см. главу II). Амнион, формирующийся из первичной эктодермы, а также все эпителиальные клетки амниотической жидкости и лимфоциты пуповинной крови являются производными эмбриональных структур. Анализ хромосом в амниоцитах и лимфоцитах плода возможен только после культивирования клеток, тогда как митотически делящиеся клетки хориона (плаценты) могут быть получены как на «прямых» препаратах, так и после культивирования. При этом «прямой» метод основан на анализе спонтанно делящихся клеток Лангханса (цитотрофобласта), а источником делящихся клеток в культуре хориона являются мезенхимальные клетки стромы ворсин. Хромосомный мозаицизм на препаратах, приготовленных любым из перечисленных способов, с равной вероятностью может относиться либо к *артефактному*, либо к *истинному (генерализованному)*, либо к *ограниченному* исследуемой ткани.

Проблема диагностики мозаицизма обостряется невозможностью точно определить представительность аномальной клеточной линии. На «прямых» препаратах из отдельных ворсинок можно выяснить степень распространенности анеуплоидной линии, т.е. определить, ограничена она клетками одной ворсины или представлена более широко. При этом остается неясной жизнеспособность зарегистрированных анеуплоидных клеток, а их локализацию в пределах всей плаценты можно установить только с помощью множественных биопсий, что реально возможно лишь при анализе последа. В специальных исследованиях методом FISH было доказано, что степень анеуплоидии в разных участках плаценты может заметно различаться (Leschot N.J. et al., 1996). Таким образом, мозаицизм может остаться нераспознанным, так как аспирируется только небольшой участок хориона/плаценты, который необязательно содержит клетки обоих клонов. При анализе только «прямых» препаратов останется незарегистрированной анеуплоидия, представленная в клетках мезенхимальной стромы, а при анализе только долгосрочных культур — аномалии в цитотрофобласте. Полная информация о распространенности в плаценте клеточных клонов с различным набором хромосом может быть получена при сочетании обоих методов.

Псевдомозаицизм, обусловленный особенностями роста клеток с разным кариотипом в условиях культуры, возникает

с частотой 0,6—1,0% и может относиться к одному из следующих трех типов (Carrega J.M., Di Renzo G.C., 1993): 1) часть колонии клеток имеет аномальный кариотип; 2) все метафазные пластинки в пределах единичной колонии демонстрируют одну и ту же хромосомную аномалию; 3) в одном культуральном флаконе более одной колонии имеют одинаковую хромосомную аномалию.

Различные пролиферативные потенции диплоидных и анеуплоидных клеток в условиях *in vitro*, очевидно, искажают их соотношения, реально существующие *in vivo*. Нам представляется, что доля анеуплоидных клеток, определенная на «прямых» препаратах, более объективно отражает частоту аномальной сегрегации хромосом *in vivo*.

Следует отметить, что в условиях *in vitro* могут варьировать темпы пролиферации клеток не только с разным кариотипом, но и разного происхождения (Кухаренко В.И., 1995). При увеличении срока культивирования амниоцитов и клеток хориона активно начинают пролиферировать материнские фибробласты и клетки эпителия, с неизбежностью попадающие в образец при амниоцентезе или хорионбиопсии. На приготовленных из таких смешанных культур препаратах метафазные пластинки могут иметь разный кариотип, что может быть неверно интерпретировано как мозаичный кариотип плода, а в случае отсутствия митотической активности клеток плода — к заключению о кариотипе плода по клеткам материнского происхождения. Вероятность таких диагностических ошибок, вызванных контаминацией образца клетками материнского происхождения и их способностью к клонообразованию, составляет 0,16% при культивировании клеток амниотической жидкости и 0,4% при культивировании клеток хориона (Carrega J.M., Di Renzo G.C., 1993). Не исключены также ошибки диагностики мозаицизма и при культивировании лимфоцитов плода, обусловленные примесями материнской крови в образце пуповинной крови.

В ПД возможны как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты, вероятность которых должна быть минимизирована на всех этапах, начиная с техники инвазивного вмешательства. По объективным причинам вероятность таких результатов не может быть полностью исключена, особенно при использовании в качестве материала для кариотипирования клеток плодных оболочек.

10.3.2. Плацентарный мозаицизм и алгоритм его диагностики

Наиболее распространенным типом ограниченного тканевого мозаицизма является ограниченный плацентарный мозаицизм (ОПМ), который регистрируется в 2% пренатальных исследований хориона при нормально развивающейся физиологической беременности (Kalousek D.K., 1997). Случаи мозаичной или полной формы гетероплоидии в тканях плода, имеющего нормальный кариотип в клетках провизорных органов, единичны (Crane J.P., Cheung S.W., 1988). При этом истинный или *генерализованный мозаицизм*, т.е. наличие аномальных клеточных линий как в тканях плода, так и в оболочках, составляет около 0,1% всех развивающихся беременностей (Kalousek D.K., 1997) и подтверждается в 10% случаев плацентарного мозаицизма (Phillips O.P. et al., 1996).

В зависимости от локализации аномальных клеток в тканях хориона различают три типа ОПМ (табл. 10.6). Наиболее частым считается первый тип (ОПМ-I), когда анеуплоидные клетки встречаются только в цитотрофобласте. Третий тип ОПМ (ОПМ-III) является самым редким (Kalousek D.K., 1997; Simoni G., Sirchia S.M., 1994) и примерно в 30% случаев сопровождается *однородительской дисомией, т.е. присутствием в кариотипе плода двух хромосом одного из родителей при отсутствии гомологичной хромосомы другого* (Lestou V.S., Kalousek D.K., 1998).

Для объяснения полной дискордантности кариотипов плодных тканей и хориона (ОПМ-III) предложена *гипотеза*

Таблица 10.6

Типы ограниченного плацентарного мозаицизма
(Simoni G., Sirchia S.M., 1994)

| Ткань | Тип 1 | Тип 2 | Тип 3 |
|-------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Цитотрофобласт | Анеуплоидия (мозаичная или полная) | Нормальный кариотип | Анеуплоидия (мозаичная или полная) |
| Мезенхимальная строма хориона | Нормальный кариотип | Анеуплоидия (мозаичная или полная) | Анеуплоидия (мозаичная или полная) |
| Ткани плода | Нормальный кариотип | Нормальный кариотип | Нормальный кариотип |

Таблица 10.7

Участие хромосом в мозаицизме, ограниченном плацентой
(Lestou V.S., Kalousek D.K., 1998)

| Тип мозаицизма | Хромосома | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | X | Y | |
| 1 | | | ■ | | | | ■ | ■ | | | | ■ | | | | | | ■ | | ■ | | | | ■ | М |
| 2 | ■ | ■ | | | ■ | | ■ | ■ | | | | ■ | ■ | | | | | | | | ■ | ■ | | | |
| 3 | | | | | | | ■ | ■ | | | | ■ | ■ | | | ■ | ■ | | | | | | | | |

Частота выявленных пренатально случаев трисомии:
 ■ > 10%, ■ 3–10%, □ не выявлены, М – моносомия.

«близнецовой беременности», согласно которой при многоплодной беременности на ранней стадии один из эмбрионов резорбируется, а другой продолжает развитие (Wolstenholme J. et al., 1994). При этом от «исчезающего близнеца» сохраняются лишь фрагменты зародышевых листков, образующие тератомы, или же фрагменты плодных оболочек, входящие в состав провизорных органов развивающегося плода. Поскольку область инвазивного вмешательства при хорионбиопсии ограничена, существует вероятность получения клеток хориона резорбированного близнеца. «Исчезновение» близнеца из dizиготической двойни примерно в половине случаев должно приводить к дискордантности по полу (Vajoria R., Kingdom J., 1997), однако мозаицизм 46,XX/46,XY отмечается крайне редко (Breed A.S.P.M., 1992). Более того, такую дискордантность кариотипов следует трактовать не как мозаицизм, а как химеризм, так как различающиеся по кариотипу клетки происходят из разных зигот. При монозиготической двойне различия по гетероморфизму аутосом, а также половым хромосомам либо должны отсутствовать, либо, в случае утраты половой хромосомы, сопровождаться кариотипом 45,X у одного из плодов (Kaplowitz P.V. et al., 1991). Следовательно, полное несоответствие кариотипов в клетках хориона и плода скорее обусловлено аномальной сегрегацией хромосом в первых делениях дробления зиготы (диплоидной или гетероплоидной).

Данные, представленные в таблице 10.7, свидетельствуют о неравном участии разных хромосом в ОПМ. Так, трисом-

ные мозаики по хромосомам 1, 4, 6, 11, 14, 17 и 19 не зарегистрированы ни в одном исследовании. В то же время трисомии 7, 13 и 18 с одинаковой частотой встречаются при том или ином типе ОПМ. Для других хромосом наблюдается неслучайная ассоциация с типом ОПМ. Наиболее ярко она выражена для 4 пар хромосом: трисомия 16 во всех случаях затрагивает всю плаценту (ОПМ-III), трисомия 2 характерна для экстраэмбриональной мезенхимы (ОПМ-II), трисомия 3 и моносомия X – для цитотрофобласта (ОПМ-I). В цитотрофобласте наиболее часто отмечаются полные или мозаичные формы трисомии 3, 7, 13, 18, 20 и 21 и редко – трисомии 8, 9, 15. С ОПМ-II обычно связаны трисомии 2, 7 и 18, а трисомии 5, 8, 9, 10, 12, 13, 21 и 22 для этого типа мозаицизма не характерны. С ОПМ-III ассоциированы, в основном, трисомии 15, 16 и 18. Таким образом, тип ОПМ в определенной степени детерминирован хромосомой, вовлеченной в нерасхождение (Robinson W.P. et al., 2001).

Особое внимание следует обратить на полиплоидию. Тетраплоидия, в отличие от других геномных мутаций, обусловлена исключительно нарушением кариотомии и цитотомии при митотическом делении клеток трофобласта. При физиологически прогрессирующей беременности она всегда ограничена плацентой. Тетраплоидные метафазные пластинки, особенно эндомитозы, сравнительно часто наблюдаются на «прямых» препаратах из хориона и плаценты, а также на препаратах культивированных амниоцитов. Как правило, тетраплоидия представлена мозаичной формой $2n/4n$, однако в некоторых случаях нормальные диплоидные метафазы в анализируемом образце хориона или плаценты могут отсутствовать. В отличие от тетраплоидии, которую в определенной степени можно считать вариантом нормального развития плаценты или же отнести к артефакту при культивировании клеток, триплоидия независимо от формы (полной или мозаичной), всегда сопровождается пороками и задержкой развития плода.

Уместно отметить, что ОПМ расценивается как один из неблагоприятных факторов, повышающих риск *внутриутробной задержки развития плода (ВЗРП)*, самопроизвольного выкидыша, антенатальной гибели или преждевременных родов (см. обзор: Кузнецова Т.В. и др., 2002). Так, частота ОПМ у спонтанных абортусов может достигать 13%, т.е. превышать почти в 6 раз этот показатель у развивающихся плодов

(Griffin D.K., 1996). По некоторым данным (Leschot N.J. et al., 1996), 1,9% беременностей с ОПМ завершаются спонтанным абортom до 28 нед. Общие потери при беременностях, сопровождающихся ОПМ, составляют 16,7% по сравнению с 2,3% в популяции (Johnson A. et al., 1990). Интересно отметить, что ОПМ регулярно регистрируется при пренатальном кариотипировании только в группах высокого риска по рождению детей с хромосомной патологией, особенно при привычном невынашивании в анамнезе, и практически не встречается при ПД моногенных болезней или по социальным показаниям (определение пола плода) (Кузнецова Т.В., 2000).

ОПМ выявляется примерно в 10% беременностей, осложненных ВЗРП (Stipoljev F. et al., 2001). При наличии ОПМ у 12,3% новорожденных отмечено снижение веса ниже 10-й процентиля (Leschot N.J. et al., 1996). С другой стороны, у доношенных детей с ВЗРП ОПМ идентифицируется в три раза чаще, чем у новорожденных, соответствующих сроку гестации (Wilkins-Haug L. et al., 1995).

Течение и исход беременности могут зависеть от пропорции аномальных клеток в трофобласте, а также от их локализации в экстраэмбриональных тканях. Так, при низком уровне аномальных клеток наличие нормальных клеточных линий в плаценте может «смягчить» их патологические эффекты настолько, что мозаицизм не имеет клинических проявлений (Johnson A. et al., 1990). Наоборот, в случаях ОПМ с достаточно высокой долей анеуплоидных клеток в плаценте наблюдаются осложнения беременности (Simoni G., Sirchia S.M., 1994). Однако, если анеуплоидия в цитотрофобласте (ОПМ-I) в 22% случаев сопровождается спонтанными абортами, ВЗРП или антенатальной гибелью плода, то при ее наличии в экстраэмбриональной мезодерме (ОПМ-II) осложнения наблюдаются значительно реже (Lestou V.S., Kalousek D.K., 1998). Аномальные исходы беременности, а также ВЗРП, коррелируют с мейотическим происхождением плацентарной трисомии и ОПМ-III (Robinson W.P. et al., 2001), которые связаны преимущественно с трисомией 16 (Lestou V.S., Kalousek D.K., 1998).

Некоторые авторы связывают ОПМ с повышенным риском внутриутробной гибели плода и не обнаруживают его связи с ВЗРП и такими осложнениями беременности, как преэклампсия и преждевременные роды (Wapner R.J. et al.,

1992). Наряду с этим сообщается об отсутствии значимого возрастания перинатальных потерь (Roland B. et al., 1994), а также какой-либо связи между акушерскими осложнениями и ОПМ по некоторым хромосомам – трисомии 8 (Saks E. et al., 1998), 12 (Bischoff F.Z. et al., 1995) и половым хромосомам (Wolstenholme J. et al., 1994).

Противоречивость литературных данных относительно влияния ОПМ на развитие плода отчасти объясняется различными клиническими критериями оценки состояния плода, а также гетерогенностью случаев ОПМ. Очевидно, что ОПМ – далеко не единственная причина задержки развития плода и других осложнений беременности. Риск неблагоприятных перинатальных исходов зависит от многих факторов.

В связи с проблемами диагностики, а также отсутствием четких прогностических критериев, в настоящее время не существует алгоритмов ведения беременности при ограниченном плацентарном мозаицизме. На основе проведенного нами анализа течения и исходов беременностей в комплекс мероприятий после диагностики ОПМ целесообразно включать анализ уровня ХГЧ в сыворотке крови беременной, а также УЗИ с оценкой резистентности сосудов и скорости кровотока в маточных артериях (Гагарина А.В. и др., 2002). *Такое углубленное динамическое наблюдение при ОПМ позволяет провести раннюю диагностику плацентарной недостаточности и своевременно начать профилактику акушерских осложнений.*

Подозрение на ОПМ должно возникать при обнаружении летальных или сублетальных хромосомных аномалий на препаратах из хориона или плаценты при отсутствии пороков развития у плода. За исключением аутомсомных моносомий, которые, как правило, обусловлены методическими артефактами, и тетраплоидии, все остальные случаи мозаичных кариотипов (мозаичная триплоидия, мозаичная трисомия по любой хромосоме набора и моносомия X), независимо от пропорции аномальных клеток, нуждаются в дополнительных исследованиях.

Последовательность диагностических мероприятий представлена на рисунке 10.3. На первом этапе для установления ОПМ желательно провести анализ долгосрочных культур. На втором – анализ хромосомного набора самого плода, для чего производится амниоцентез или – предпочтительнее – кордоцентез. Окончательный диагноз устанавливается

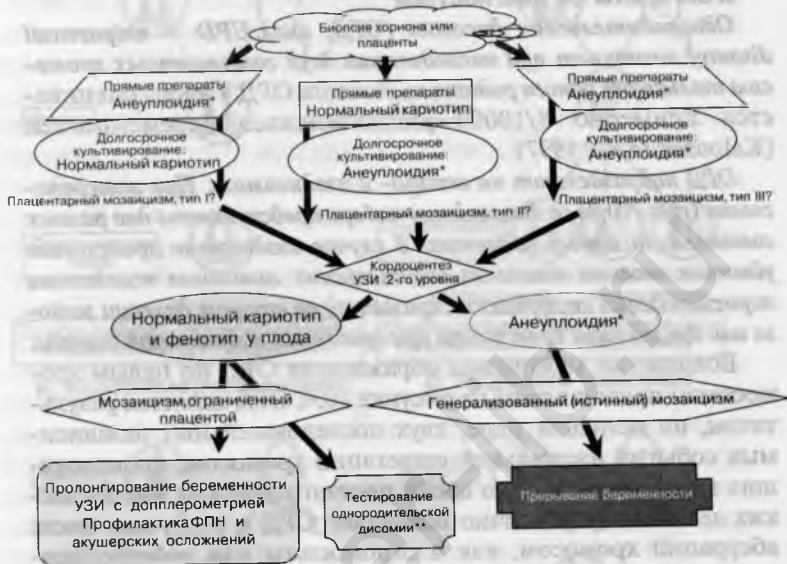


Рис. 10.3. Стандартный диагностический алгоритм при хромосомном мозаицизме в хорионе (плаценте).

* Анеуплоидия, представленная трисомиями по аутосомам, половым хромосомам или моносомией X (в виде полной или мозаичной формы).

** Тестирование однородительской дисомии рекомендуется при ограниченном плацентарном мозаицизме 3-го типа, особенно при мозаичных трисомиях по хромосомам, для которых эффект импринтинга доказан (хромосомы 6, 7, 11, 14, 15, 16, 20).

только после получения информации о кариотипе в клетках плода.

В зависимости от локализации аномального клона рекомендации могут быть различны. В случае **истинного (генерализованного) мозаицизма** рекомендуется прерывание беременности. При нормальном кариотипе у плода и любом типе плацентарного мозаицизма рекомендуется пролонгирование беременности и УЗИ с доплерометрией в динамике. В случае полной формы анеуплоидии в плаценте, особенно по хромосомам, для которых известны «болезни импринтинга», целесообразно тестирование молекулярными методами однородительской дисомии (ОРД) (см. 10.3.3).

10.3.3. Однородительская дисомия и алгоритм ее диагностики

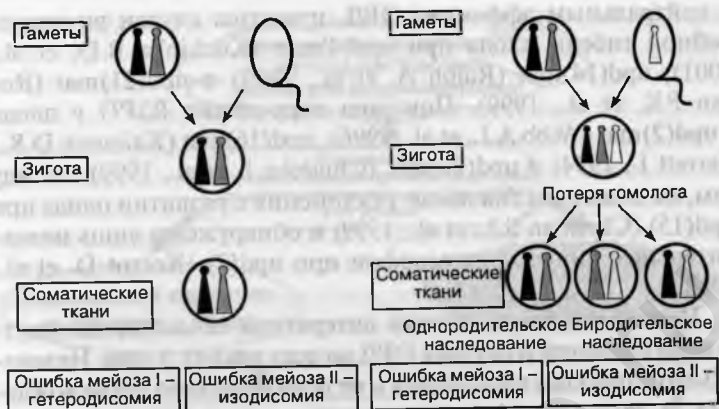
Однородительская дисомия (ОРД, англ. UPD – uniparental disomy) возникает при наследовании двух гомологичных хромосом только от одного родителя. Частота ОРД у плода оценивается примерно 8/10000 развивающихся беременностей (Kalousek D.K., 1997).

ОРД подразделяют на гетеро- и изодисомию. При гетеродисомии (рис. 10.4), в диплоидном наборе представлены два разных гомолога от одного родителя. В случае изодисомии происходит удвоение только одного из родительских гомологов вследствие нерасхождения сестринских хроматид во втором делении мейоза или дупликации хромосомы при дроблении моносомной зиготы.

Возможные механизмы образования ОРД по целым хромосомам представлены на рисунке 10.4. ОРД является результатом, по меньшей мере, двух последовательных независимых событий аномальной сегрегации хромосом, происходящих в гаметогенезе и во время постзиготических митотических делений. Аналогично возникает ОРД и в случаях таких aberrаций хромосом, как изохромосомы или Робертсоновские транслокации.

Клинические проявления ОРД могут быть обусловлены либо геномным импринтингом (моноаллельной экспрессией генов, зависящей от их родительского происхождения), либо проявлением мутантных рецессивных аллелей в случае изодисомии.

ОРД приводит к четко очерченным синдромам только в постнатальном онтогенезе. Список хромосом, по которым известны случаи ОРД, достаточно велик, хотя в нем представлены не все хромосомы. *Эффект импринтинга* четко установлен лишь для 5 пар хромосом (хромосомы 7, 10, 11, 14, 15) и предполагается для хромосом 2 и 16 (Hsu L.Y. et al., 1997). Его отсутствие показано при ОРД по 14 другим парам хромосом (Ledbetter D.H., Engel E., 1995). Наиболее изученными «*болезнями импринтинга*» являются синдромы Прадера–Вилли (upd(15)mat) и Ангельмана (upd(15)pat), синдром Беквита–Видемана (upd(11)pat) и синдром Сильвера–Рассела (upd(7)mat) (Devriendt K., 2000). Известны случаи диабета у новорожденных при upd(6)pat (Christian S.L. et al., 1996). Upd(14) имеет различное фенотипическое проявление в зависимости от ее родительского происхождения: при материнской дисомии отмечается преждевременное половое созревание



А. Комплементация гамет

Б. Редукция трисомии



В. Дупликация мейотической моносомии



Г. Дупликация митотической моносомии

Рис. 10.4. Механизмы формирования однородительской дисомии.

ние (Fokstuen S. et al., 1999), тогда как при отцовской – карликовость (Walter C.A. et al., 1996). Описано также несколько случаев upd(7)pat/mat у пациентов с муковисцидозом – одним из наиболее частых моногенных заболеваний (Ledbetter D.H., Engel E., 1995).

Влияние ОРД на развитие плода и течение беременности пока мало изучено. Так, для одних и тех же хромосом, наряду

с нейтральным эффектом ОРД, известны случаи внутриутробной гибели плода при upd(4)mat (Kuchinka B.D. et al., 2001), upd(14)mat (Ralph A. et al., 1999) и upd(21)mat (Rogan P.K. et al., 1999). Показана корреляция ВЗРП у плода с upd(2)mat (Webb A.L. et al., 1996), upd(16)mat (Kalousek D.K., Barrett I., 1994) и upd(20)mat (Chudoba I. et al., 1999). Между тем, не выявлены значимые отклонения в развитии плода при upd(15) (Christian S.L. et al., 1999) и обнаружены лишь незначительные лицевые дизморфии при upd(7) (Kotzot D. et al., 2000).

Неоднозначность данных литературы объясняется отсутствием сведений о случаях ОРД во всех тканях плода. Независимо от природы хромосомы и ее родительского происхождения, а также от типа дисомии (изо- или гетеродисомия), при всех известных случаях ОРД у плода отмечено наличие трисомных клеточных клонов в тканях плаценты. Напомним, что теоретически «псевдодиплоидный» кариотип с ОРД у плода может оказаться в каждом третьем случае ОПМ-III, т.е. при полной форме анеуплоидии во всех тканях плаценты. Это обстоятельство не позволяет дискриминировать повреждающий эффект собственно ОРД у плода от влияния аномальной плаценты. Следовательно, ***рассматривать ОРД как изолированный фактор, неблагоприятно влияющий на развитие плода, по-видимому, преждевременно. Однако пренатально диагностированная ОРД может существенно влиять на тактику ведения беременности.***

ОРД у плода должна быть заподозрена во всех случаях ОПМ. Особого внимания в плане ОРД заслуживают трисомии по хромосомам, содержащим кластеры импринтированных генов (хромосомы 6, 7, 11, 14, 15, 16, 20). Верификация ОРД у плода при мозаичном статусе трисомии по хромосомам 2, 4 и 5 в плаценте не столь целесообразна, так как ее негативное влияние на развитие плода не доказано (Vellisariou V., 2003). Подозрение на ОРД должно возникать также и в случаях отсутствия гетероморфизма (т.е. морфологической идентичности) гомологов по районам гетерохроматина или ядрышковых организаторов. Уместно отметить, что ни подтвердить, ни исключить ОРД цитогенетическими методами невозможно. Для тестирования ОРД используются молекулярно-генетические методы, рекомендуемые для пренатальных исследований (Назаренко С.А., Саженова Е.А., 2004). Диаг-

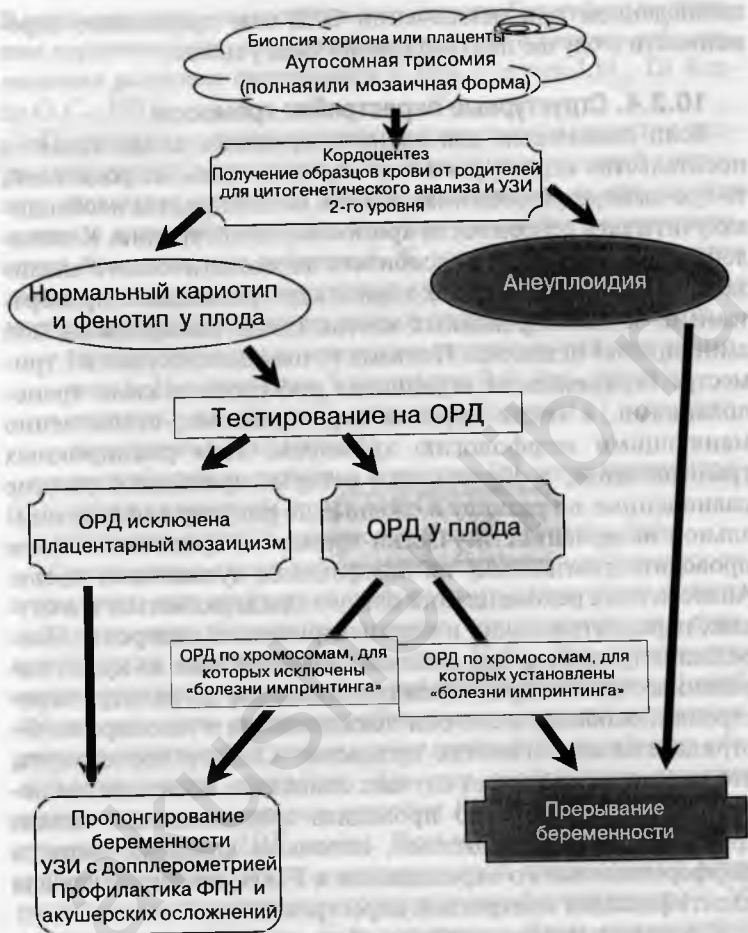


Рис.10.5. Диагностический алгоритм при подозрении на однородительскую дисомию у плода.

ностика ОРД в этих случаях основана на сравнительном анализе образцов ДНК из крови родителей и плода, что предполагает проведение кордоцентеза. Последовательность диагностических мероприятий для верификации ОРД у плода при плацентарном мозаицизме представлена на рисунке 10.5. Рекомендации по дальнейшему ведению беременности могут быть различными – пролонгирование беременности под УЗ

наблюдением при исключении ОРД или прерывание беременности в случае подтверждения ОРД у плода.

10.3.4. Структурные перестройки хромосом

Если показанием для кариотипирования плода является носительство структурной перестройки одним из родителей, то при выборе способа инвазивного вмешательства необходимо учитывать особенности хромосомной аберрации. К сожалению, разрешающая способность цитогенетического анализа на «прямых» препаратах хориона по сравнению с препаратами из культивированных клеток плода (лимфоцитов или амниоцитов) невысока. Поэтому точная диагностика в I триместре беременности ограничена Робертсоновскими транслокациями, а также другими перестройками, существенно меняющими морфологию хромосом. При реципрокных транслокациях, в образовании которых принимают участие равноценные по размеру и сходные по рисунку дифференциальной исчерченности участки хромосом, предпочтительнее проводить диагностику по лимфоцитам пуповинной крови. Аналогичных рекомендаций следует придерживаться и в случаях парацентрических и перичцентрических инверсий. Наибольшие трудности при анализе хромосом даже из культивированных клеток представляют небольшие по размеру перестройки, особенно если они локализованы в теломерных G-отрицательных сегментах хромосом. Следует подчеркнуть, что практически во всех случаях семейного носительства перестроек целесообразно проводить сравнительный анализ хромосом плода и родителей, используя комплекс методов дифференциального окрашивания и FISH, необходимых для идентификации конкретной перестройки.

Спонтанные хромосомные аберрации, т.е. перестройки, не унаследованные от кого-либо из родителей при подтвержденном отцовстве, пренатально встречаются относительно редко (0,06–0,20% от всех исследований) (Carrega J.M., Di Renzo G.C., 1993). В наших исследованиях их частота составила 0,07% (у 5 из 7579 плодов).

При обнаружении хромосомной перестройки, действительно возникшей *de novo*, невозможно полностью исключить сопутствующие микроперестройки, и, следовательно, несбалансированность хромосомного набора, и, тем более, определить наличие генных мутаций в точках разрывов.

В этой ситуации, *согласно рекомендациям Европейского общества перинатологов, риск рождения ребенка с какими-либо аномалиями развития оценивается в 10%* (Carrega J.M., Di Renzo G.C., 1993).

Принимая во внимание, что информация о развитии плода, полученная с помощью УЗИ, ограничена оценкой состояния отдельных органов и систем, *желательно во всех случаях неясного цитогенетического диагноза проводить кариотипирование биологических родителей.* К таким случаям относятся также структурно полиморфные участки хромосом, которые необходимо дифференцировать от структурных аномалий:

- прицентромерные гетерохроматиновые районы хромосом 1, 16 и особенно 9 (варианты 9qh, 9ph, 9phqh);
- спутники на коротких плечах хромосомы 17 и на длинном плече Y-хромосомы;
- переменные размеры коротких (p) плеч акроцентрических хромосом групп D и G;
- длинное плечо Y-хромосомы, включая район Yqh.

Стандартная схема диагностики структурных перестроек, в том числе при отсутствии информации о кариотипе родителей на момент проведения анализа, предполагает ряд диагностических мероприятий (см. рис. 10.6). *При обнаружении структурной перестройки (или подозрении на ее наличие) необходимо уточнить ее происхождение, т.е. провести кариотипирование родителей. В любом случае необходимо определить сбалансированность aberrации, для чего предпринять попытки уточнения точек разрывов методом FISH с использованием locus-специфичных ДНК-зондов.* При установлении родительской принадлежности сбалансированной хромосомной aberrации рекомендуется пролонгирование беременности с УЗ контролем в динамике. *Если установлен факт возникновения морфологически сбалансированной aberrации de novo, необходимо проинформировать беременную о высоком риске отклонений в развитии плода, а также психических и физических нарушений у ребенка после рождения.* Рекомендации по ведению беременности в этом случае целесообразно вырабатывать на пренатальном консилиуме с привлечением неонатологов и педиатров. *В случае несбалансированного кариотипа, обусловленного перестройкой de novo или унаследованного от родителей вследствие сегрегации перестроенных хромосом, рекомендуется прерывание беременности.* Следует подчеркнуть, что кариотипи-

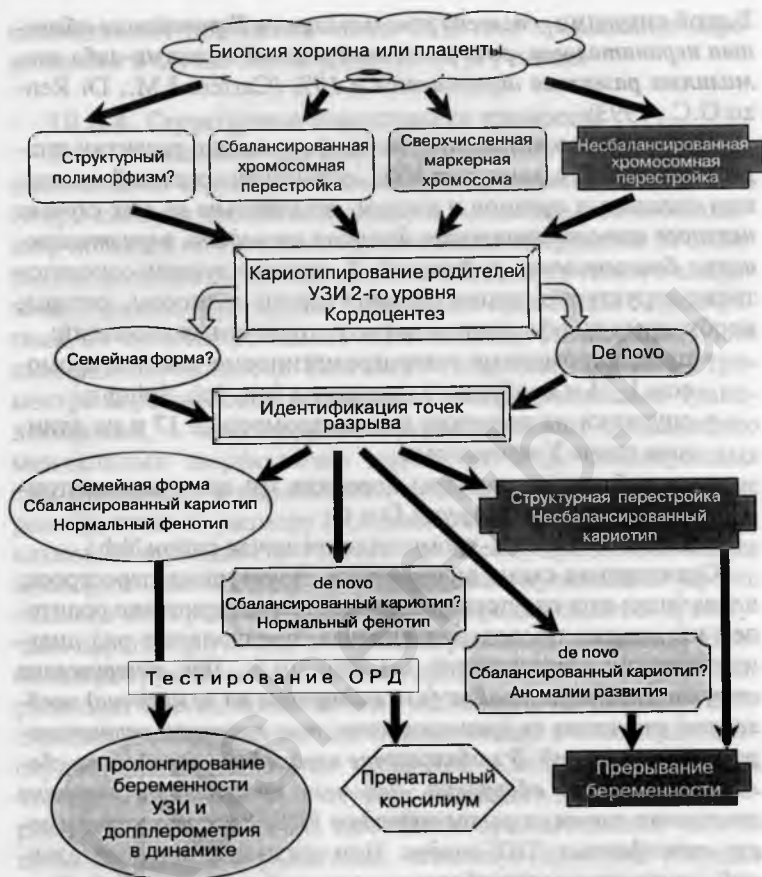


Рис. 10.6. Принципиальная схема пренатальной диагностики хромосомных мутаций.

рование родителей при обнаружении любой хромосомной перестройки у плода является обязательным, т.к. имеет принципиальное значение не только для диагностики при настоящей беременности, но и для прогноза здоровья будущих детей. Зачастую носители структурных перестроек выявляются именно в таких ситуациях.

Носители хромосомных мутаций (реципрокных и робертсоновских транслокаций, изохромосом, маркерных хромосом), относятся также к группе повышенного риска по ОРД

у плода. Наличие хромосомных перестроек приводит к образованию гамет с частичной или полной анеуплоидией, при последующей коррекции которой возникает ОРД по хромосомам или сегментам хромосом, вовлеченных в перестройку. В этих группах, а priori имеющих риск ОРД у плода, целесообразно заранее предусмотреть получение пуповинной крови одновременно для цитогенетической и молекулярной диагностики во избежание повторных инвазивных манипуляций.

Особенного внимания заслуживают робертсоновские транслокации с участием хромосом 14 и 15. При этом риск ОРД составляет 0,65%, если aberrантная хромосома образована негомологичными хромосомами, и 66% – если она представлена транслокацией между гомологами или изохромосомой (Vellisariou V., 2003). В случаях обнаружения при пренатальном кариотипировании таких структурных перестроек, наследуемых или возникших *de novo*, рекомендуется тестирование ОРД.

10.3.5. Сверхчисленные маркерные хромосомы

Маркерными хромосомами обычно называют сверхчисленные хромосомы неизвестного происхождения. Некоторые из них являются результатом внутрихромосомных, другие – межхромосомных перестроек. Условно маркерные хромосомы можно подразделить на несколько групп:

- 1) по происхождению (возникшие *de novo* и наследуемые),
- 2) по форме геномной мутации (мозаичные и немозаичные),
- 3) по морфологии (спутничные, т.е. содержащие короткие плечи акроцентрических хромосом, и несателлитные).

Маркерные хромосомы в пренатальном периоде выявляются с частотой 0,6–0,96:1000 (Hsu L.Y.F., 1992). В зависимости от генетического материала, входящего в состав маркерной хромосомы, они могут сопровождаться пороками или задержкой развития плода, иметь серьезные клинические проявления сразу после рождения, затрагивать только репродуктивную или ментальную функции, либо фенотипически никак не проявляться. Определение природы маркерных хромосом всегда представляет значительные трудности, однако их идентификация при пренатальном кариотипировании, даже если они относятся к семейным формам, имеет принципи-

альное значение для тактики дальнейшего ведения беременности.

При обнаружении маркерной хромосомы у плода необходимо кариотипировать родителей для установления происхождения маркера (семейная форма или мутация *de novo*), провести идентификацию маркера всеми доступными методами и определить форму анеуплоидии (полная или мозаичная).

Прогноз более благоприятен, если один из фенотипически нормальных родителей (а также его родственники с нормальными репродуктивной функцией и интеллектом) является носителем идентичной маркерной хромосомы, представленной в той же форме (мозаичной или полной).

Из 6 случаев ПД наследование маркерной хромосомы наиболее полно — в трех поколениях — нам удалось проследить только в двух семьях (рис. 10.7, 10.8). В одной из семей, где моносателлитная маркерная хромосома содержала короткое плечо хромосом 13 или 21 с неактивными ядрышкообразующими районами, ПД проводилась дважды (рис. 10.7). Первая беременность закончилась срочными родами здоровой девочки, унаследовавшей маркерную хромосому, вторая — рождением здорового мальчика с нормальным мужским кариотипом. В другом случае (рис. 10.8) маркерная хромосома оказалась бисателлитной, при этом ядрышкообразующие районы, принадлежащие хромосомам 14 или 22, проявляли различную активность *p*-генов. К сожалению, весь генетический материал маркерных хромосом идентифицирован не был, что не позволило установить полную идентичность маркерных хромосом у плодов и их матерей. Однако наличие в родословных представителей с нормальным кариотипом давало основание предполагать, что маркеры не содержали участков, дисбаланс по которым был бы несовместим с жизнью или нормальным психомоторным развитием.

Эти примеры подтверждают мнение об относительной нейтральности наследуемых маркерных хромосом, если они являются производными коротких плеч хромосом групп D и/или G (Carrera J.M., Di Renzo G.C., 1993). Однако функциональный дисбаланс по рибосомным генам в некоторых случаях может сопровождаться невынашиванием беременности у женщин-носителей или неблагоприятно сказываться на

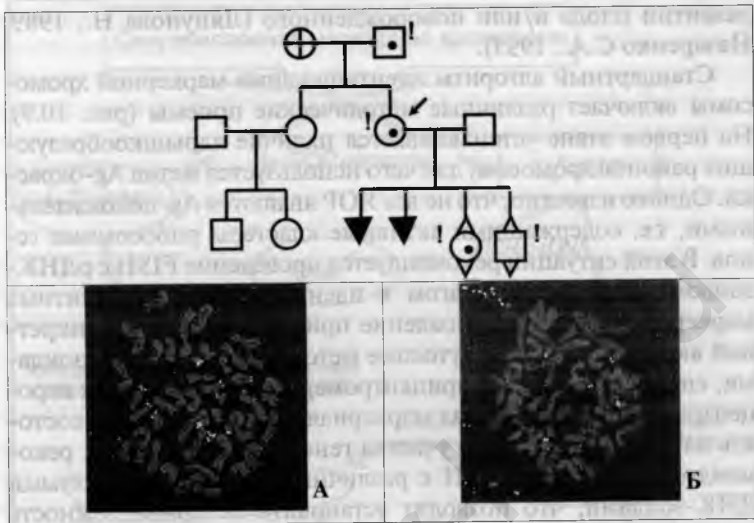


Рис. 10.7. Наследование и идентификация маркерной хромосомы *der* (13 or 21) в семье 2286. Клетки цитотрофобласта (А, Б) (16 нед. беременности). FISH с гДНА (А) и с ДНК-зондом D13Z1/D21Z1 (Б).

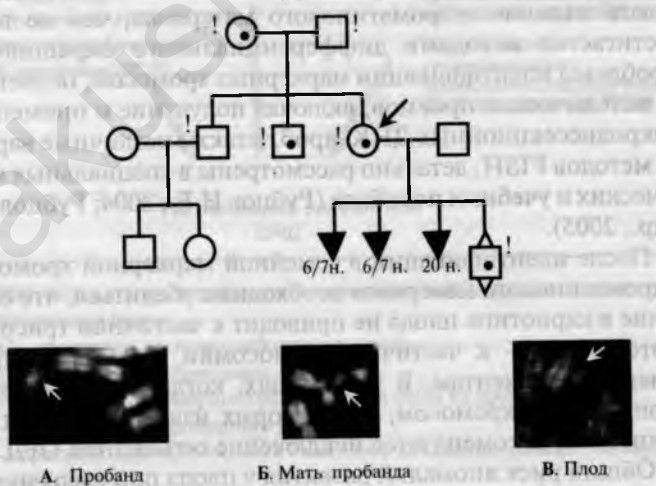


Рис. 10.8. Наследование маркерной хромосомы в семье 4172. Фрагменты метафазных пластинок из лимфоцитов периферической крови (А, Б) и клеток цитотрофобласта (В). Окраска QFH/ACD.

развитии плода и/или новорожденного (Ляпунова Н., 1989; Назаренко С.А., 1993).

Стандартный алгоритм идентификации маркерной хромосомы включает различные методические приемы (рис. 10.9). На первом этапе устанавливается наличие ядрышкообразующих районов хромосом, для чего используется метод Ag-окраски. Однако известно, что не все ЯОР являются Ag-положительными, т.е. содержащими активные кластеры рибосомных генов. В этой ситуации рекомендуется проведение FISH с рДНК-зондом. Следующим шагом в идентификации сателлитных маркеров является установление принадлежности к конкретной акроцентрической аутосоме методом FISH с ДНК-зондами, специфическими к прицентромерным районам всех акроцентриков. Несателлитная маркерная хромосома может состоять из материала любого участка генома. Прежде всего, рекомендуется провести FISH с различными прицентромерными ДНК-зондами, что позволит установить ее принадлежность к конкретной хромосоме. Отсутствие сигнала, специфического для прицентромерного района какой-либо из 24 хромосом (22 аутосомы, X и Y), может указывать на наличие у маркерной хромосомы участка с неоцентромерной активностью.

Во всех случаях маркерных хромосом необходимо устанавливать наличие эухроматинового материала, что не всегда достигается методами дифференциального окрашивания. Проблемы идентификации маркерных хромосом, особенности методических приемов, включая получение и применение микродиссекционных ДНК-проб, а также различные варианты методов FISH, детально рассмотрены в специальных методических и учебных пособиях (Рубцов Н.Б., 2004; Рубцов Н.Б. и др., 2005).

После идентификации в семейной маркерной хромосоме эухроматинового материала необходимо убедиться, что ее наличие в кариотипе плода не приводит к частичной трисомии, а отсутствие — к частичной моносомии по содержащимся в маркере сегментам. В тех случаях, когда маркер является производным хромосом, для которых известен эффект импринтинга, рекомендуется исключение сегментной ОРД.

Общий риск аномалий развития у плода при сверхчисленных маркерных хромосомах, возникших *de novo*, составляет около 8% для сателлитных маркеров (состоящих из коротких плеч акроцентрических аутосом, несущих рибосомные гены)

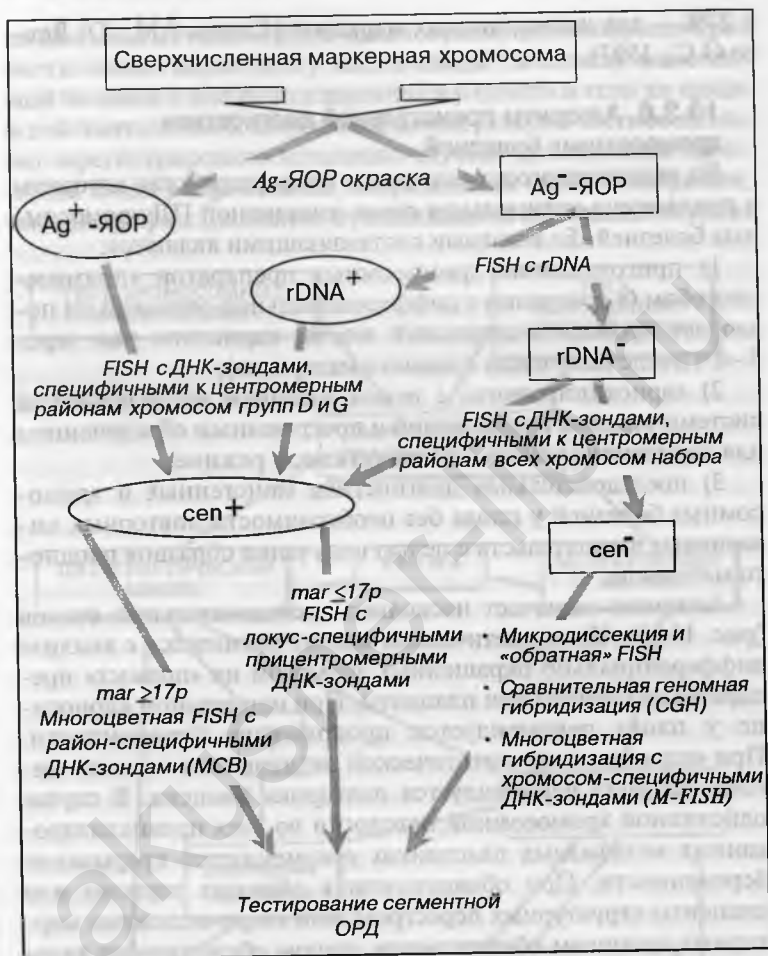


Рис. 10.9. Алгоритм идентификации сверхчисленных маркерных хромосом.

Обозначения на схеме:

rDNA⁺ – наличие кластеров рибосомных генов,

rDNA⁻ – отсутствие рибосомных генов,

cen⁺ – наличие центромерного района какой-либо из хромосом,

cen⁻ – отсутствие центромерного района,

17p – короткое плечо хромосомы 17 как репер для оценки размера маркерной хромосомы (mar).

и 27% – для несателлитных маркеров (Carrera J.M., Di Renzo G.C., 1993).

10.3.6. Алгоритм пренатальной диагностики хромосомных болезней

На основе многолетнего опыта нами разработан алгоритм и предложена оптимальная схема инвазивной ПД хромосомных болезней. Ее важными составляющими являются:

1) приготовление хромосомных препаратов «прямым» способом (в сочетании с дифференциальной окраской он позволяет проводить детальный анализ кариотипа уже через 3–4 ч после получения плодного материала);

2) кариотипирование с использованием автоматической системы анализа изображений и программным обеспечением для кариотипирования в интерактивном режиме;

3) последовательная диагностика моногенных и хромосомных болезней у плода без необходимости повторных инвазивных вмешательств с целью получения образцов плодного материала.

Алгоритм включает несколько последовательных этапов (рис. 10.10). Цитогенетический анализ начинается с анализа дифференциально окрашенных хромосом на «прямых» препаратах из хориона или плаценты. При нормальном кариотипе у плода рекомендуется продолжение беременности. При недостаточной митотической активности в клетках цитотрофобласта рекомендуется повторная биопсия. В случае однотипной хромосомной патологии во всех проанализированных метафазных пластинках рекомендуется прерывание беременности. При обнаружении в образцах хориона или плаценты структурных перестроек или сверхчисленных маркерных хромосом обязательным этапом обследования является кариотипирование родителей и УЗИ второго или экспертного уровня. Как правило, предлагается проведение кордоцентеза для уточнения кариотипа плода. Аналогичная тактика (УЗИ 2-го или экспертного уровня и кордоцентез) целесообразна и в случаях обнаружения хромосомного мозаицизма в плаценте. По результатам кордоцентеза с учетом данных УЗИ рекомендуется продолжение беременности или, в случае подтверждения патологии, ее прерывание.

Если показанием к инвазивной ПД является высокий риск моногенной болезни у плода, то после исключения основно-

го диагноза методами ДНК-диагностики, целесообразно провести анализ кариотипа у такого плода. Сочетание моногенной болезни и патологии кариотипа у одного и того же плода в действительности встречается не так редко. В частности, нами зарегистрировано несколько случаев хромосомной патологии плода у беременных, направленных на ПД гемофилии, миодистрофии Дюшенна, муковисцидоза и фенилкетонурии.

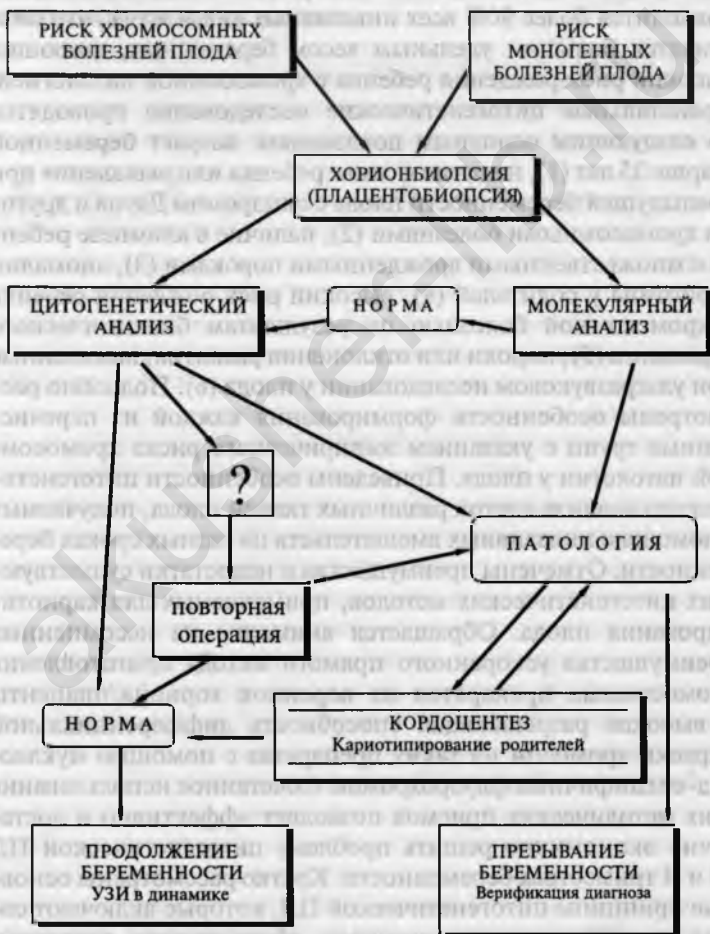


Рис. 10.10. Принципиальная схема инвазивной пренатальной диагностики наследственных болезней.

Поэтому во избежание повторных инвазивных вмешательств при планировании ПД моногенных болезней необходимо предусмотреть получение материала, пригодного не только для ДНК-диагностики, но и цитогенетического анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитогенетические исследования с целью кариотипирования плода — один из важнейших разделов ПД. На их долю приходится более 90% всех инвазивных диагностик, что объясняется большим удельным весом беременных, имеющих высокий риск рождения ребенка с хромосомной патологией. Пренатальные цитогенетические исследования проводятся по следующим основным показаниям: возраст беременной старше 35 лет (1), наличие в семье ребенка или выявление при предыдущей беременности плода с синдромом Дауна и другими хромосомными болезнями (2), наличие в анамнезе ребенка с множественными врожденными пороками (3), аномалии кариотипа у родителей (4), высокий риск рождения ребенка с хромосомной болезнью по результатам биохимического скрининга (5), пороки или отклонения развития, выявленные при ультразвуковом исследовании у плода (6). Подробно рассмотрены особенности формирования каждой из перечисленных групп с указанием эмпирического риска хромосомной патологии у плода. Приведены особенности цитогенетического анализа клеток различных тканей плода, получаемых с помощью инвазивных вмешательств на разных сроках беременности. Отмечены преимущества и недостатки существующих цитогенетических методов, применяемых для кариотипирования плода. Обращается внимание на несомненные преимущества ускоренного прямого метода приготовления хромосомных препаратов из ворсинок хориона/плаценты и высокая разрешающая способность дифференциальной окраски хромосом на таких препаратах с помощью нуклеотид-специфичных флуорохромов. Сочетанное использование этих методических приемов позволяет эффективно и достаточно экономично решить проблему цитогенетической ПД в I и II триместрах беременности. Кратко рассмотрены основные принципы цитогенетической ПД, которые включают состав и квалификацию персонала, оборудование, реактивы, показатели качества цитогенетических исследований. Специальный раздел главы посвящен диагностическим проблемам,

возникающим при оценке результатов цитогенетического исследования плода. Главные из них: структурные перестройки, возникшие *de novo*, сверхчисленные маркерные хромосомы, мозаицизм хромосом, в том числе мозаицизм хромосом, ограниченный плацентой, и однородительская дисомия. Подробно рассмотрена каждая из этих проблем цитогенетической ПД и даны оптимальные алгоритмы, позволяющие минимизировать возникающие сложности и правильно интерпретировать полученные результаты.

akusher-lib.ru

ГЛАВА XI. ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

11.1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ

Генные болезни – наследственные болезни, вызванные мутациями в отдельном, как правило, одном гене (моногенные болезни).

На долю генных нарушений приходится в общей сложности до 5% всей врожденной патологии (Бочков Н.П., 1995; Гинтер Е.К., 2003). Из них собственно моногенные болезни составляют около 1%. Для ПД представляют интерес генные болезни, приводящие к тяжелой, нередко смертельной патологии, в отношении которой пока отсутствуют или все еще малодоступны методы лекарственной терапии. Из более 6000 заболеваний, известных на сегодняшний день, доля заболеваний, безусловно, заслуживающих ПД, составляет не более 1% (McKusick V.A., 1997). Более половины случаев моногенной патологии, требующих ПД, составляют такие сравнительно частые и тяжелые болезни, как муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна–Беккера, синдром ломкой (фрагильной) X-хромосомы, гемофилия А и В, фенилкетонурия, атаксия Фридрейха, спинально-мышечная атрофия, врожденная вирилизирующая гиперплазия коры надпочечников или адреногенитальный синдром и некоторые другие. ПД именно этих социально-значимых моногенных заболеваний является особенно актуальной.

Впервые в России ПД с использованием ДНК-методов была осуществлена в Санкт-Петербурге в 1987 г. у женщины высокого риска по рождению ребенка с *муковисцидозом*. К настоящему времени в стране проведено уже свыше 1500 ПД моногенных болезней. Более 700 из них выполнено в нашем Центре. Это позволило предотвратить рождение 250 детей с тяжелыми моногенными болезнями, в том числе с муковисцидозом, фенилкетонурией, гемофилиями А и В, миодистро-

Для болезней, сцепленных с полом, т.е. контролируемых генами, локализованными в X-хромосоме, характерно то, что болеют преимущественно мальчики, тогда как носителями мутаций являются девочки (рис. 11.2). Все рецессивные аллели X-хромосомы у мальчиков проявляются, так как находятся в *гемизиготном* состоянии (эти гены не имеют своих гомологов на мужской Y-хромосоме). Девочки могут болеть в том случае, если они гомозиготны по такой мутации. Такая возможность может осуществиться в семье, где болен отец, а мать является носителем мутации и передала дочери свой мутантный аллель. Если отец больной девочки здоров, можно предполагать, что мутация возникла в его гамете, которая участвовала в оплодотворении. X-сцепленные заболевания у девочек (миодистрофия Дюшенна, гемофилия А) могут быть следствием сочетанного проявления мутации этих генов у одного из родителей и делеции соответствующих фрагментов хромосом у другого. В этих редких случаях у девочек, как и у мальчиков, мутации X-сцепленных генов будут находиться в гемизиготном состоянии.

Примерно 1/3 случаев миодистрофии Дюшенна, а также гемофилии А, являются следствием спонтанных мутаций, возникших в процессе оогенеза. Причиной этих заболеваний может быть и *гонадный мозаицизм*, обусловленный присутствием в яичниках как нормальных, так и мутантных гамет (см. главу X).

При *доминантном наследовании* для развития болезни достаточно одного мутантного аллеля. Такие больные с вероятностью 50% рождаются в семьях, где один из родителей болен. Очень редко болезни с доминантным типом наследования встречаются в потомстве здоровых родителей вследствие спонтанной мутации одной из гамет. Однако вероятность повторного рождения больного ребенка в такой семье такая же, как и для популяции в целом. ПД доминантных болезней проводится достаточно редко. Значительно чаще встречаются *моногенные болезни с частичным доминированием* и *неполной пенетрантностью*. Для подобных заболеваний риск рождения больного ребенка в отягощенной семье зависит от конкретных значений этих параметров, которые, в свою очередь, определяются молекулярными механизмами, лежащими в основе формирования таких мутаций, наследование которых отклоняется от менделевского типа.

В частности, это относится к особому классу моногенных заболеваний, вызванных так называемыми динамическими мутациями. Суть мутации заключается в нарастании числа *триплетных повторов*, расположенных в регуляторных или в кодирующих участках генов. Впервые такой тип мутации был обнаружен при молекулярном анализе синдрома *фрагильной (ломкой) X-хромосомы* (синдром Мартина–Белл), наследование которой не подчиняется обычным менделевским законам (Hirst M.C. et al., 1991). В дальнейшем динамические мутации были описаны и при других наследственных заболеваниях, контролируемых генами, расположенными на разных хромосомах (Горбунова В.Н., Баранов В.С., 1997). Для триплетных повторов, экспансия которых блокирует функцию гена, характерен выраженный популяционный полиморфизм, причем число аллелей может варьировать от единиц до нескольких десятков. Другой их особенностью является доминантный тип наследования, характерный как для X-сцепленных генов, так и для генов, находящихся на аутосомах. Особенностью практически всех *болезней «экспансии»* является также *эффект антиципации (ожидания)*, смысл которого заключается в нарастании тяжести симптомов заболевания в последующих поколениях, что, как оказалось, является результатом дальнейшего увеличения числа триплетов после того, как их количество превысило нормальное значение.

11.3. ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ГЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Основой методов ДНК-диагностики, направленных на идентификацию мутаций или молекулярное маркирование мутантных хромосом, является полимеразная цепная реакция синтеза ДНК (сокращенно ПЦР). Исторически более ранний метод блот-гибридизации по Саузерну в значительной мере утратил свои приоритеты, хотя и используется до настоящего времени для идентификации некоторых мутаций, прежде всего «динамических мутаций», ведущих к болезням экспансии (синдром фрагильной X-хромосомы, миотоническая дистрофия, хорей Гентингтона, ряд нейродегенеративных заболеваний), а также гемофилии А и некоторых других заболеваний.

Метод ПЦР предложен в 1983 г. американским исследователем Карри Муллисом, удостоенным за это открытие Нобе-

левской премии в 1993 г. Метод позволяет избирательно синтезировать (амплифицировать) *in vitro* относительно небольшие участки ДНК, длиной от нескольких десятков до нескольких тысяч пар нуклеотидов, используя в качестве матрицы любые образцы ДНК, содержащие амплифицируемую последовательность.

Необходимым условием для проведения ПЦР является знание нуклеотидной последовательности амплифицируемой области ДНК, так как специфический выбор этого участка осуществляют путем гибридизации матричной ДНК с двумя искусственно синтезированными праймерами – олигонуклеотидными последовательностями ДНК, длиной от 15 до 30 пар оснований (п.о.), комплементарными 3'-концам амплифицируемого участка на смысловой и антисмысловой нитях ДНК соответственно (рис. 11.3). Расстояние между праймерами определяет длину синтезируемых молекул.

Метод ПЦР стал одним из основных в молекулярной диагностике наследственных болезней. Разработаны и широко используются в практике различные варианты данного метода, позволяющие быстро и эффективно идентифицировать мутации, изучать ДНК-полиморфизмы, применяемые для молекулярного маркирования мутантных хромосом.

В настоящее время в ПД, как и в диагностике генных болезней, существуют два основных подхода (рис. 11.4):

- прямая диагностика, основанная на непосредственной идентификации мутаций в определенном гене;
- косвенная (непрямая) диагностика, в основе которой лежит маркирование мутантного гена (иногда называемая маркированием «больной» хромосомы, несущей мутантный ген) с помощью молекулярных маркеров (Ивашенко Т.Э. и др., 1999).

11.3.1. Прямая диагностика

Основу прямой диагностики составляет идентификация мутаций в самом гене. Преимущества метода – высокая (приближающаяся к 100%) точность, возможность ПД, при предварительном типировании мутаций в семье и обследовании только родителей без анализа образца больного, а также выявление гетерозиготных носителей.

Недостаток метода – при отсутствии мажорных мутаций гена требуется детальный молекулярный анализ (секвениро-

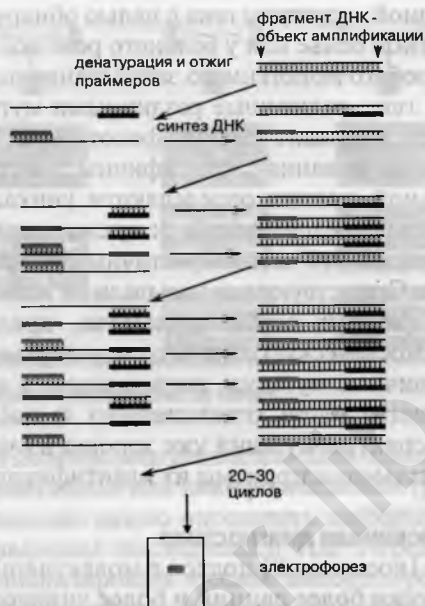


Рис. 11.3. Принципиальная схема полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Прямой метод
анализ мутации гена

Непрямой (косвенный) метод
анализ молекулярных маркеров,
расположенных рядом с мутантным
геном или внутри него

Преимущества

Высокая (до 100%) точность
Предварительное типирование
мутаций в семье может быть
произведено путем обследования
родителей без анализа больного

Метод универсален, его можно
использовать при отсутствии
данных о точных молекулярных
повреждениях мутантного
гена и даже до того,
как ген точно идентифицирован

Недостатки

Эффективен при наличии точной
информации о природе, частоте и
локализации наиболее частых
(мажорных) мутаций гена либо о
наличии в нем легко мутирующих
-горячих- точек

Необходимость наличия в семье
больного пробанда, анализ ДНК
которого позволяет установить,
с каким именно молекулярным
маркером сцеплен мутантный ген

Рис. 11.4. Основные подходы молекулярной диагностики моногенных заболеваний.

вание) первичной структуры гена с целью обнаружения мутаций в конкретной семье или у больного ребенка.

В основе любого моногенного заболевания лежат нарушения функций гена, вызванные различными мутациями. Тип и спектры мутаций, равно как и их фенотипическое проявление (тяжесть заболевания), специфичны для каждого гена и в значительной степени определяются уникальными особенностями его последовательности нуклеотидов.

Известно также, что частота различных мутаций в каждом гене различна. Существуют так называемые *мажорные мутации*, частота которых особенно высока, представляющие большую диагностическую ценность, и *минорные*, или спорадические единичные мутации, встречающиеся сравнительно редко. Для многих генов, ответственных за наследственные заболевания, спектры мутаций уже хорошо изучены и разработаны оптимальные алгоритмы их идентификации.

11.3.2. Косвенная диагностика

Непрямой (косвенный) подход в молекулярной диагностике исторически более ранний и более универсальный. Он основан на анализе полиморфных сайтов ДНК, которые могут располагаться либо внутри самого мутантного гена, либо находиться в непосредственной близости от него. В качестве полиморфных сайтов обычно выступают короткие ДНК-последовательности одних и тех же гомологичных участков хромосом, отличающиеся по своей первичной структуре.

Непременным условием косвенной ДНК-диагностики является возможность исследования ДНК больного ребенка (пятен крови, гистологических препаратов и пр.). Установление информативности предусматривает выявление такого полиморфного сайта, который может быть использован в качестве молекулярного маркера как мутантного, так и нормально-го аллеля. В случае аутосомно-рецессивных заболеваний родители будут определяться как гетерозиготы по данному полиморфизму, а больной будет гомозиготой по одному из маркерных аллелей. Именно гетерозиготность по молекулярным маркерам определяет информативность той или иной семьи высокого риска рождения ребенка с генной патологией. В зависимости от распределения маркерных аллелей на гомологичных хромосомах больного и его родителей семья может

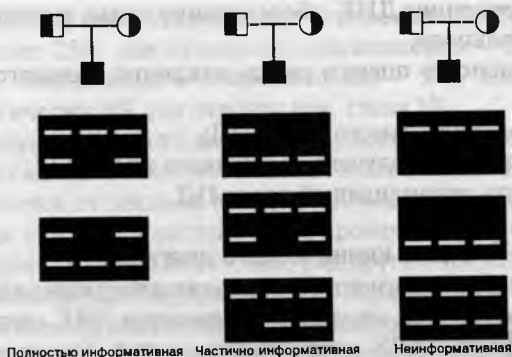


Рис.11.5. Примеры информативности семьи.

быть полностью информативной для ДНК-диагностики, частично информативной или неинформативной (рис. 11.5).

Принципиально важно определить информативность семьи для проведения последующей ПД. Нередко при этом приходится анализировать в семье высокого риска большое количество полиморфных маркеров для одного гена, чтобы точно определить, с каким конкретным аллелем наследуется мутантный ген, и выбрать оптимальный вариант ПД.

Основные преимущества косвенного метода – возможность ДНК-диагностики без точной идентификации мутаций в самом гене и даже при отсутствии данных о точной идентификации и клонировании самого мутантного гена. Существенными недостатками косвенного метода являются невозможность диагностики при отсутствии больного ребенка (нельзя точно определить, с каким полиморфным аллелем сцеплен мутантный ген) и вероятность ошибки диагностики в связи с возможностью кроссинговера в мейозе и переноса полиморфного сайта на здоровый аллель (Горбунова В.Н., Баранов В.С., 1997).

11.4. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПД ГЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Принимая во внимание высокую точность молекулярных методов, их большую чувствительность, необходимо помнить, что эффективность ДНК-диагностики у плода в значительной мере требует соблюдения следующих основных требований:

- точность клинического диагноза;

- своевременное ДНК-обследование семьи высокого риска и больного;
- правильность оценки риска рождения больного ребенка;
- выбор оптимального срока ПД;
- возможность получения материала плода;
- четкость рекомендаций после ПД.

11.4.1. Точность клинического диагноза

Молекулярная диагностика проводится на уровне индивидуальных генов, точнее, на уровне фрагментов ДНК самих генов или близлежащих ДНК-последовательностей. Отсутствие точного клинического диагноза моногенного заболевания делает, по сути, невозможным применение молекулярных методов.

11.4.2. Своевременность обследования семьи высокого риска

Моногенное заболевание может быть результатом разных мутаций в одном гене. Идентификация таких мутаций в каждой семье — необходимое условие успешной ПД. Особенно важно, чтобы идентификация мутаций (*прямая диагностика*) и молекулярное маркирование мутантных хромосом (*косвенная диагностика*) были проведены при наличии в семье больного ребенка. Поэтому ДНК-обследование каждой семьи высокого риска следует проводить, не дожидаясь наступления следующей беременности. При этом особую диагностическую ценность представляют образцы ДНК самого больного. *В случае отсутствия в семье больного ребенка и невозможности точно идентифицировать мутации у родителей ПД молекулярными методами невозможна.* Своевременное направление семей или образцов крови семей высокого риска в соответствующие центры ДНК-диагностики для выяснения информативности семьи, т.е. ее пригодности для ДНК-диагностики — важная функция кабинетов медико-генетического консультирования.

11.4.3. Правильность оценки риска рождения больного ребенка

Правильность постановки клинического диагноза предполагает и правильность оценки риска рождения больного ребенка.

Известно, что для аутосомно-рецессивных заболеваний он составляет 25%, для аутосомно-доминантных — 50%, для болезней, сцепленных с X-хромосомой — 50% для мальчиков и практически 0% для девочек (см. главу V).

Особую сложность для оценки риска представляют болезни «экспансии», наследование которых нередко существенно отклоняется от законов Менделя. К числу таких болезней относятся синдром фрагильной X-хромосомы, миотоническая дистрофия, хорея Гентингтона, ряд других нейродегенеративных заболеваний (Горбунова В.Н., Баранов В.С., 1997).

При оценке риска особого внимания заслуживают заболевания, для которых велика вероятность гонадного мозаицизма (т.е. мутантные клетки присутствуют только в некоторых клеточных клонах гонад и не определяются в соматических клетках), как, например, при миодистрофии Дюшенна или гемофилии А.

Следует также учитывать, что для ряда нозологий (например, гемофилия А, миодистрофия Дюшенна) характерна необычно высокая частота спонтанных мутаций соответствующих генов (фактора VIII свертывания крови и дистрофина, соответственно). Поэтому до решения вопроса о ПД в таких семьях особенно важно установить наличие гетерозиготного носительства мутации соответствующих генов у матери.

11.4.4. Выбор оптимального срока ПД

Решающим преимуществом молекулярной диагностики является ее универсальность, т.е. возможность использовать для анализа любые ДНК-содержащие клетки организма или ткани. Анализ может быть проведен на любой стадии онтогенеза, начиная со стадии зиготы.

Уже сегодня около 30 моногенных болезней, в том числе и таких частых, как муковисцидоз, фенилкетонурия, миодистрофия Дюшенна, гемофилии А и В можно диагностировать в доимплантационном периоде (Баранов В.С. и др., 2002). Исходя из интересов женщины, оптимальным для ПД молекулярными методами считается I триместр. Это, однако, требует детального молекулярно-генетического анализа образцов ДНК семьи высокого риска по заболеванию еще до наступления беременности. Нередко ДНК-диагностику проводят и во II триместре, особенно в случае частично информативных семей, когда существует возможность дополнить

ДНК-диагностику соответствующими биохимическими (при муковисцидозе) или серологическими (при гемофилии А) тестами.

11.4.5. Получение материала для ПД молекулярными методами

В отличие от биохимических методов ДНК-диагностика возможна на любых клетках самого плода и его провизорных органов. Такие клетки могут быть получены при помощи стандартных инвазивных процедур (см. главу IX). Образцы ДНК выделяют из биоптатов хориона (плаценты), клеток амниотической жидкости или лимфоцитов пуповинной крови. При необходимости для молекулярного анализа можно использовать соскоб клеток с цитологических препаратов, ранее использованных для кариотипирования плода.

11.4.6. Четкость рекомендаций после пренатальной молекулярной диагностики

Результатом пренатальной ДНК-диагностики может быть подтверждение диагноза или его снятие. В последнем варианте плод может быть гетерозиготным носителем (аутосомно-рецессивные болезни) или не быть носителем мутантного гена.

В любом случае женщина (семья) должна быть в максимально короткие сроки осведомлена о результатах диагностики с оценкой степени риска рождения больного плода, гетерозиготного носителя или здорового ребенка.

В случае высокого риска рождения больного ребенка женщине может быть рекомендовано прерывание беременности, однако окончательное решение о сохранении или прерывании беременности всегда остается прерогативой самой пациентки (см. главу V). В случае прерывания беременности при наличии соответствующих условий настоятельно рекомендуется верификация диагноза молекулярными или другими доступными методами.

11.5. Точность молекулярной диагностики, возможные источники ошибок

При всей своей безусловной точности и даже универсальности ПД молекулярными методами не лишена возможных ошибок, главными причинами которых могут быть: 1) контаминация плодного образца материнскими клетками;

2) в случае использования косвенного метода – кроссинговер мутантного сайта (его перемещение на соответствующий участок гомологичной хромосомы в процессе мейоза).

Учитывая крайне высокую чувствительность метода ПЦР, избежать загрязнения образцов плодных тканей материнскими клетками можно только путем тщательного отбора ворсин хориона или плаценты под бинокулярной лупой с последующим отмыванием физиологическим раствором. Особенно важно не допустить попадания материнской крови при заборе пуповинной крови плода при проведении кордоцентеза. Высокий уровень профессионализма оператора и использование качественных реактивов на выявление примеси материнской крови позволяют гарантировать чистоту материала. Риск диагностических ошибок вследствие неправильного получения плодного материала для молекулярно-генетических исследований может быть значительно уменьшен при работе в стерильных условиях.

Достоверность молекулярной диагностики прямым методом, т.е. путем идентификации мутаций в самом гене очень высока. Несмотря на это, учитывая все многообразие возможных изменений в геноме при созревании гамет (кроссинговер) и на начальных стадиях эмбриогенеза (мутагенный эффект), более оправданной является точность диагностики около 99,9%. Значительно сложнее оценка результатов молекулярной диагностики косвенным методом. В случае учета внутригенных полиморфизмов точность непрямой диагностики достаточно высока, так как величина внутригенного кроссинговера для большинства известных генов, как правило, не превышает 0,1%. Исключение могут составлять только сравнительно крупные гены, такие как ген дистрофина, фактора VIII, нейрофиброматоза и некоторые другие. Так, ошибка диагноза при анализе гена дистрофина может достигать 2%, что соответствует высокой частоте внутригенного кроссинговера. Важно также учитывать степень родства больного и пробанда, у которого проводится ПД. Величина ошибки возрастает, если маркерный аллель определяется не у сибса плода, а у других его родственников. Особенно осторожно следует оценивать результаты непрямой диагностики с использованием внегенных полиморфных локусов. Считается, что с уверенностью проводить ПД в этих случаях можно только при одновременном тестировании нескольких полиморф-

ных сайтов, фланкирующих мутантный ген. Обычно для молекулярной диагностики используют маркеры, частота рекомбинаций которых с мутантными аллелями гена не превышает десятых или сотых долей процента.

11.6. КОМБИНИРОВАННАЯ ДИАГНОСТИКА

В ряде случаев (отсутствие или частичная информативность) ДНК-диагностика некоторых заболеваний может быть дополнена другими исследованиями. В случае гемофилии А возможно прямое определение уровня фактора VIII свертывания крови в пуповинной крови плода после 20-й недели беременности. ДНК-диагностика аденогенитального синдрома может быть дополнена прямым исследованием содержания 17-ОН прогестерона в амниотической жидкости. ПД синдрома ломкой X-хромосомы нередко дополняют прямым цитогенетическим анализом культуры лимфоцитов пуповинной крови плода, ДНК-диагностика миодистрофии Дюшенна принципиально может быть дополнена иммуноцитохимическим анализом биоптатов скелетных мышц плода.

В случае муковисцидоза дополнительная информация о состоянии плода может быть получена путем биохимического исследования активности ферментов амниотической жидкости на 17–19-й неделях беременности.

11.7. АЛГОРИТМЫ ПД НЕКОТОРЫХ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ МОНОГЕННЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ В РОССИИ

11.7.1. Муковисцидоз

Муковисцидоз (МВ) (кистозный фиброз поджелудочной железы) — наиболее распространенное, тяжелое моногенное заболевание, наследуемое по аутосомно-рецессивному типу. Частота заболевания в разных популяциях, нациях и этнических группах существенно варьирует, составляя в среднем 1:2–2500 новорожденных у представителей белой расы. В Европейской части РФ частота МВ снижается до 1:6–6500 (Ивашенко Т.Э., Баранов В.С., 2002).

Молекулярно-генетическими методами ген МВ картирован на длинном плече хромосомы 7 (7q31.1) в 1985 г. В конце 1989 г. идентифицирован сам ген МВ и выявлена наиболее частая мутация — delF508, приводящая к этому заболеванию. Охарактеризован белковый продукт этого гена, получивший

название «трансмембранный регуляторный белок муковисцидоза» (CFTR) (Kerem B.S. et al., 1989; Riordan J.M. et al., 1989; Rommens J.M. et al., 1989). Помимо мутации delF508 в гене CFTR обнаружено много других мутаций. В отличие от delF508, подавляющее большинство из них представлено спорадическими случаями, т.е. встречается достаточно редко. К концу 2005 г. в гене CFTR идентифицированы более 1500 точечных мутаций, несколько делеций и дупликаций.

К диагностически значимым мутациям, приводящим к МВ в России, помимо delF508 (54%) можно отнести 394delTT, G542X, 2143delT, 2184insA, W1282X, N1303K, 3737delA, CFTRdel21kb, частота которых превышает 2%. Анализ всего лишь 5 мутаций гена CFTR (394delTT, delF508, CFTRdel21kb, 2184insA, 2143delT) позволяет идентифицировать до 70% всех мутантных хромосом у пациентов с МВ России (Ивашенко Т.Э., Баранов В.С., 2002).

На основе полученных данных о частотах и спектре мутаций гена CFTR у пациентов с МВ России, а также ДНК-полиморфизмов в различных популяциях и у больных муковисцидозом разработан оптимальный алгоритм проведения пренатальной диагностики МВ в семьях высокого риска (см. рис. 11.6). Данный алгоритм состоит из 3 основных этапов. На 1-м этапе обрабатываются варианты наиболее простой и надежной прямой молекулярной диагностики (идентификация мутаций), на 2-м (при наличии больного ребенка и отсутствии идентифицируемых мутаций) – варианты косвенной диагностики (ПДРФ-анализ) и, наконец, на 3-м (*если семья полностью неинформативна для ДНК-диагностики*) – проводится биохимическая диагностика по активности ферментов микроворсинок кишечника плода в амниотической жидкости. Данный алгоритм с использованием комплексного подхода и применением всего спектра методов – молекулярных и биохимических – позволяет провести ПД на любой стадии внутриутробного развития плода.

11.7.2. Миодистрофия Дюшенна–Беккера

Миодистрофия Дюшенна–Беккера – сцепленная с полом мышечная дистрофия. Частота заболевания составляет 1 на 5000 новорожденных мальчиков. Выделяют две клинические формы заболевания: тяжелую – миодистрофию Дюшенна

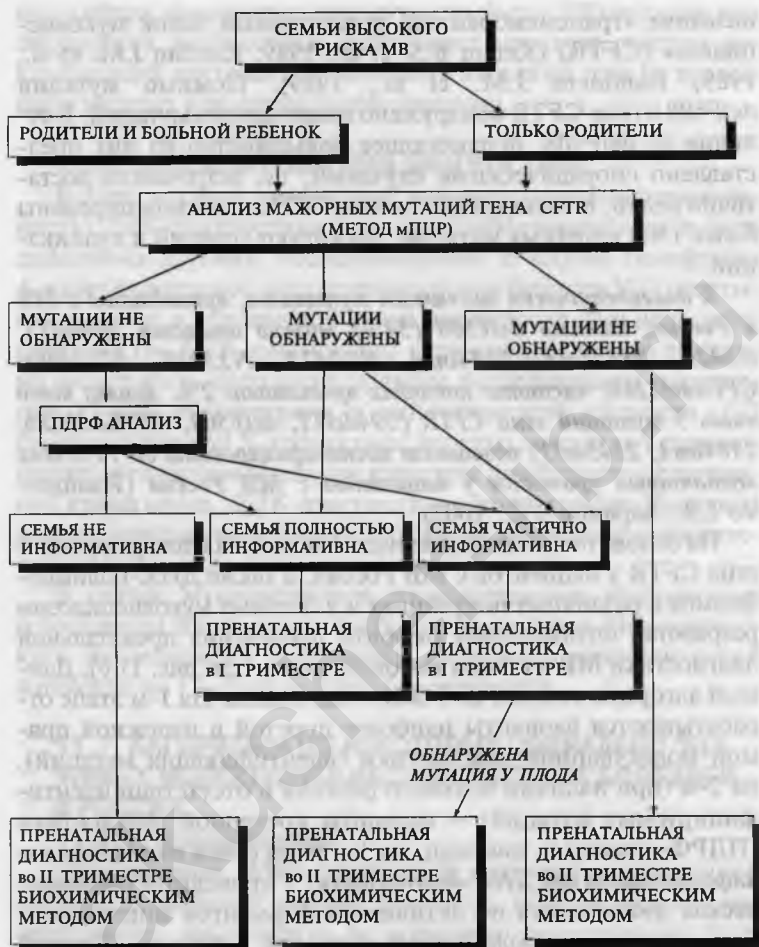


Рис.11.6. Принципиальная схема пренатальной диагностики МВ.

(МД) и гораздо более мягкую – миодистрофию Беккера (МБ).

Ген миодистрофии Дюшенна (DMD) – самый крупный из известных генов человека, картирован на коротком плече X-хромосомы в области Xp21. Ген DMD кодирует белок дистрофин, входящий в состав сарколеммы мышечного волокна. При МД дистрофин либо полностью отсутствует, либо деградирует вскоре после синтеза. При МБ, как правило, дистрофин при-

сутствует, хотя и в измененном, чаще всего укороченном варианте. В 68% случаев в гене DMD у больных мальчиков обнаруживаются протяженные делеции, захватывающие от одного до нескольких соседних экзонов. Делеции, обычно, локализованы в двух «горячих» районах – в области 5'-конца гена (экзоны 6–19) и в 3'-конце (экзоны 40–53). При этом 30% делеций встречаются в проксимальной части гена и 70% – в дистальной (Горбунова В.Н., Баранов В.С., 1997).

Разработаны эффективные методы диагностики делеций в DMD-гене, основанные на *мультиплексной ПЦР*. Основу метода составляет одновременное тестирование 18 экзонов промоторной части гена, что позволяет выявить до 98% всех крупных делеций. В случае отсутствия идентифицируемой делеции применяют косвенный метод ДНК-диагностики, в котором используют внутригенные полиморфные сайты: рERT87-8/Taq1, рERT87-15/BamH1, I24/Pst1, 16intron/Taq1, и динуклеотидные СА-повторы в интронах 49 и 50 – STR-49, STR-50. В случае косвенного метода точность диагностики снижается с 99 до 94%. На основе собственных данных разработан оптимальный алгоритм ПД миодистрофии Дюшенна (см. рис. 11.7).

11.7.3. Гемофилия А

Гемофилия А – сцепленное с полом заболевание, вызванное наследственным дефектом фактора VIII, важнейшего звена в системе свертывания крови. Комплекс фактора VIII с молекулярной массой более 1 млн. дальтон состоит из двух компонентов. Главный компонент – VIIIС, кодируется геном F8С, локализованным в X-хромосоме. С VIIIС нековалентно связан фактор Виллебранда – VIIIР, кодируемый аутосомным геном. Фактор Виллебранда стабилизирует фактор VIII и регулирует его активность.

Ген F8С – один из наиболее протяженных генов человека; содержит 26 экзонов размером от 69 до 3106 нуклеотидов. Общая длина *интронов (некодующих участков)* составляет 177 тыс. п.о., около 20% этой ДНК приходится на интрон 22 (32,4 тыс. п.о.).

Изолированные случаи гемофилии А составляют 30%, семейные варианты – 70%. Около 10% всех идентифицированных мутаций в гене F8 являются делециями одного или нескольких смежных экзонов. Примерно 5% всех мутаций

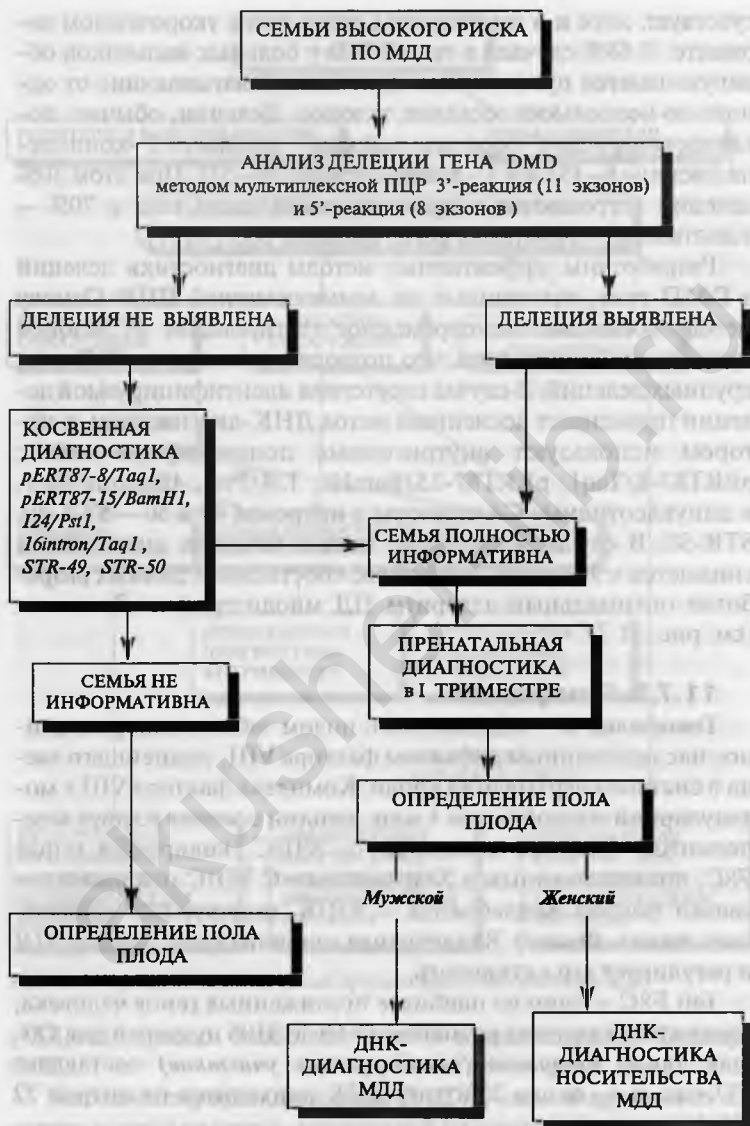


Рис. 11.7. Принципиальная схема пренатальной диагностики МДД.

составляют короткие делеции и дупликации гена, остальные представлены точковыми заменами. Для подавляющего большинства мутаций гена F8С характерно практически полное отсутствие «горячих» точек: каждая семья высокого риска по гемофилии А имеет свою собственную мутацию. Исключение составляет группа протяженных инверсий интрона 22, захватывающих экзоны 1–22. Функция гена при этом полностью заблокирована. Такие инверсии, как оказалось, присутствуют в 45% семей с тяжелой формой гемофилии А (Lakich D. et al., 1993).

Прямая диагностика протяженных инверсий в гене F8 осуществляется методом блот-гибридизации с ДНК-зондом р482.6 после рестрикции суммарной геномной ДНК эндонуклеазами BclI, DgaI, NcoI. В остальных случаях, из-за отсутствия мажорных мутаций в гене F8С, чаще всего используют косвенные методы молекулярной диагностики.

С помощью ПЦР анализируют полиморфные динуклеотидные СА-повторы экзона 13, HindIII полиморфизм в интроне 19, HbaI полиморфизм в интроне 22 и внегенный полиморфизм локуса DXS52 (St14/TaqI) (см. рис. 11.8).

11.7.4. Фенилкетонурия

Фенилкетонурия (ФКУ) — одно из наиболее частых ауто-сомно-рецессивных заболеваний, обусловленных наследственным дефектом фенилаланингидроксилазы, приводящим при отсутствии своевременной диетотерапии к тяжелой умственной отсталости. В России частота заболевания колеблется в пределах 1:8–10 000 новорожденных.

Гидроксилирование фенилаланина является достаточно сложным процессом, в котором участвуют по крайней мере 3 фермента. Фенилаланингидроксилаза (РАН), гомополимерный фермент, состоящий из субъединиц с молекулярной массой 52 кДа, продуцируется клетками печени и регулирует превращение L-фенилаланина в L-тирозин. Его дефицит приводит к накоплению фенилаланина в сыворотке крови. Гиперфенилаланинемия может возникать также при дефиците дигидроптеридинредуктазы и при дефектах синтеза биоптерина. Эти заболевания хотя и сопровождаются снижением активности РАН, значительно отличаются от классической формы ФКУ и не корригируются диетой, лишенной фенилаланина.

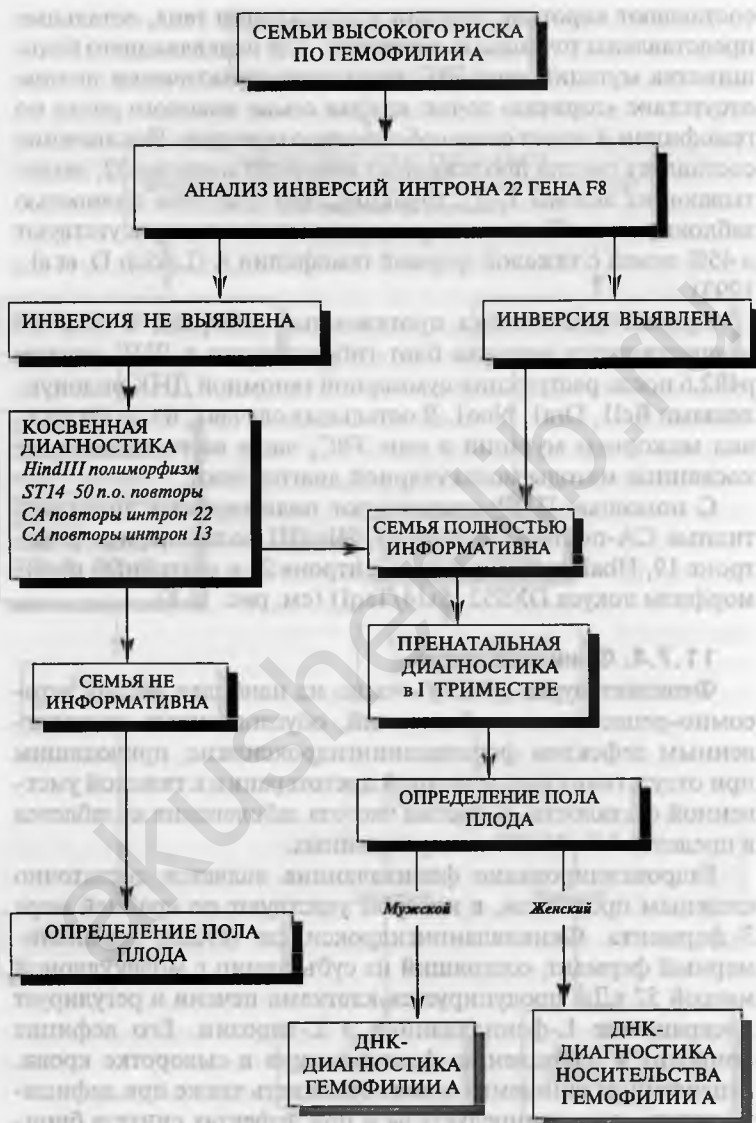


Рис. 11.8. Принципиальная схема пренатальной диагностики гемофилии А.

Ген РАН *транскрибируется (считывается)* в гепатоцитах с образованием мРНК размером 2,4 тыс. п.о. Наиболее распространенный тип мутаций – однонуклеотидные замены (миссенс-, нонсенс-мутации и мутации в сайтах сплайсинга). Крупных структурных перестроек в гене РАН не найдено, хотя иногда встречаются однонуклеотидные делеции.

Отмечен неравномерный характер внутригенной локализации мутаций. Наибольшее число миссенс-мутаций встречается в центральной части гена: в экзоне 7, кодирующем участок связывания белка с кофактором, где расположено 5 CpG-дуплетов, а также в экзонах 9 и 12. Преимущественный район локализации делеций – экзоны 1, 2 и 3 (Горбунова В.Н., Баранов В.С., 1997). *Наиболее частой мажорной мутацией в гене РАН является мутация R408Q, которая, по нашим данным, встречается с частотой 45%.*

В медицинской практике используется как прямая, так и косвенная диагностика мутаций в РАН-гене (см. рис. 11.9).

При анализе семьи, в которой отсутствуют легко идентифицируемые прямыми методами мутации, молекулярная диагностика может быть проведена с помощью внутригенных полиморфных сайтов рестрикции. Информативен для диагностики, в частности, MspI полиморфизм в 8-м экзоне. Его анализ может быть осуществлен методом ПЦР/рестрикции. В последнее время появились данные о наличии высокополиморфных сайтов внутри *интронов* гена РАН, которые оказались особенно подходящими для молекулярного маркирования мутантных аллелей.

11.7.5. Врожденная гиперплазия коры надпочечников

Врожденная гиперплазия коры надпочечников (ВГКН), или адреногенитальный синдром, является клиническим синдромом, развитие которого связано с нарушением секреции кортикостероидов вследствие врожденного дефекта ферментов, ответственных за биосинтез этих гормонов. В 95% случаев ВГКН является результатом дефицита фермента 21-гидроксилазы (цитохром P450c21).

По своим клиническим проявлениям данное заболевание весьма разнообразно. Известны две классические формы ВГКН: сольтеряющая (СТФ) и простая вирильная (ПФ) и одна неклассическая форма (НФ). Частота «классических» форм составляет 1:10000 новорожденных, «неклассической» –

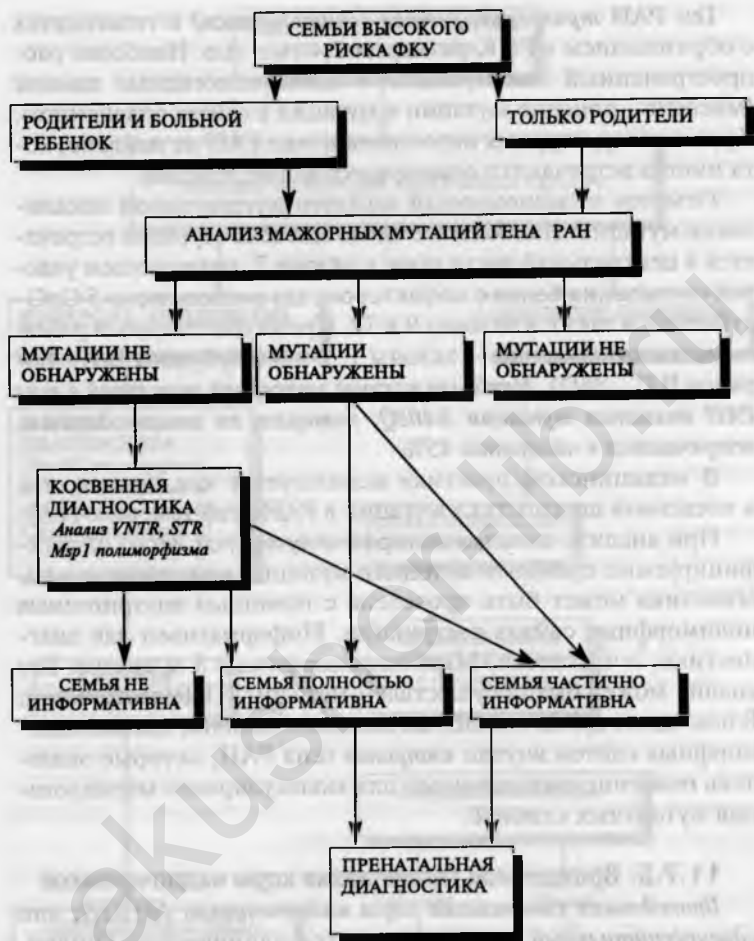


Рис. 11.9. Принципиальная схема пренатальной диагностики ФКУ.

около 1% в популяции. Наиболее тяжелой является сольтеряющая форма, которая проявляется в нарушении солевого обмена *гипонатриемией* и *гиперкалиемией*, что, в свою очередь, обусловлено нарушением способности почек к реабсорбции ионов натрия. В основе этого лежит полная утрата ферментативной активности 21-гидроксилазы, что при отсутствии адекватного лечения может приводить к летальному исходу.

При простой вирильной форме в организме не синтезируется достаточное количество кортизола. При этом накопившиеся предшественники кортизола: 17-гидроксипрогестерон, прегненолон, 17-гидроксипрегненолон и прогестерон в сетчатом слое коры надпочечников конвертируются в надпочечниковые андрогены, поэтому ПФ характеризуется прогрессирующей вирилизацией и ускоренным соматическим развитием. Пониженная концентрация кортизола в крови стимулирует синтез кортиколиберина гипоталамусом, что, в свою очередь, ведет к повышенной секреции АКТГ и, следовательно, к гиперплазии коры надпочечников.

Третья, неклассическая форма — наиболее легкая по сравнению с остальными, проявляется в подростковом возрасте в период полового созревания. У пациентов наряду с различными клиническими проявлениями наблюдается умеренное повышение в сыворотке крови уровня 17-гидроксипрогестерона.

Нарушения в работе фермента 21-гидроксилазы возникают в результате различных мутационных повреждений в гене CYP21B, кодирующем данный фермент. Ген 21-гидроксилазы картирован на коротком плече хромосомы 6 (участок бр21.3). Сложность молекулярной диагностики при ВГКН в том, что

Таблица 11.1

**Корреляция мутаций в гене CYP21B
с клиническими формами ВГКН**

| Мутации | Локализация мутации | Форма заболевания (СТФ, ПФ, НФ) |
|-------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| delB | — | СТФ |
| P30L | 89 C→T | НФ |
| I2B | 656A/C→G | СТФ, ПФ |
| del8bp | Δ708-715 | СТФ |
| I172N | 1001 T→A | ПФ |
| I236N V237E M239K | 1382 T→A 1385 T→A 1391 T→A | СТФ |
| V281L | 1685 G→T | НФ |
| Q318X | 1996 C→T | СТФ |
| R356W | 2110 C→T | СТФ |
| P453S | 2580 C→T | НФ |

в данном локусе на самом деле находятся не один, а два тандемно (друг за другом) расположенных гена — функционально активный ген СУР21В и его неактивная копия (псевдоген) — СУР21А. Последний неактивен из-за присутствия в его последовательности нескольких «тяжелых» мутаций (делеция в 3-м экзоне, инсерция со сдвигом рамки считывания в 7-м экзоне и нонсенс-мутация — в 8-м экзоне). Наличие рядом с кодирующим геном гомологичной ДНК-последовательности псевдогена зачастую ведет к нарушениям конъюгации (спаривания) гомологичных хромосом в мейозе (см. главу X) и, как следствие этого, к *конверсии* этих генов — *перемещению фрагмента активного гена на псевдоген*, либо к делеции части смыслового гена.

Делеция гена является одним из наиболее частых нарушений в гене СУР21В при сольтеряющей и простой вирильной формах ВГКН. Многими зарубежными и отечественными авторами (Осиновская Н.С. и др., 2000; White P.C. et al., 1986, 2002; Morel Y., Miller W.L., 1991) показано, что для каждой клинической формы ВГКН характерен свой спектр диагностически значимых мутаций (табл. 11.1).

Разработана оптимальная схема обследования пациентов с ВГКН. На первом этапе проводится детекция мутаций, соответствующих клинической форме заболевания. На втором исследуется ген на наличие сопутствующих мутаций, возникающих в результате рекомбинационных событий. Такой алгоритм применим и при проведении ПД в семьях высокого риска ВГКН. Важно отметить, что исследование ДНК плода не должно ограничиваться детекцией только тех мутаций, которые были идентифицированы у родителей пробанда. Необходимо иметь представление о гене в целом, чтобы, по возможности, исключить возникновение мутаций *de novo*.

В заключение следует отметить, что ПД ВГКН возможна и биохимическим методом, путем анализа содержания 17-гидроксипрогестерона в амниотической жидкости или в сыворотке крови плода. Этот метод имеет ряд ограничений, основным из которых является отсутствие стандартизированных норм уровня 17-гидроксипрогестерона в околоплодной жидкости и в сыворотке крови плода на разных сроках развития. В случае стертых форм заболевания этот показатель не полностью отражает реальную картину заболевания.

11.7.6. Спинальная мышечная атрофия

Спинальная мышечная атрофия (СМА) является одним из наиболее распространенных летальных рецессивных наследственных нейромышечных заболеваний. В европейских популяциях данная патология встречается с частотой 1 на 10000 новорожденных. По тяжести клинических проявлений СМА подразделяют на три типа: I – острая форма (болезнь Верднига–Гоффмана), II – средняя (промежуточная) форма с летальным исходом после 2 лет; III – хроническая форма (болезнь Кугельберга–Веландера). В большинстве случаев причиной спинальной мышечной атрофии являются мутации в гене выживания моторных нейронов – SMN1 (98%). У 95% пациентов с СМА основным типом мутаций являются делеции в гене SMN1. Примерно у 2% пациентов с СМА заболевание вызвано мутациями гена ингибитора запрограммированной гибели нейронов – NAIP, расположенного рядом с геном SMN. Оба гена (SMN1 и NAIP) локализованы на длинном плече хромосомы 5. Каждый из них существует в виде собственно гена и псевдогена (SMN2). Функционально активный ген SMN1 отличается от своей копии (SMN2) восемью нуклеотидами: 5 из которых находятся в интронах и три – в экзонах 6, 7 и 8. Функционально неактивная копия гена NAIP имеет делецию экзонов 5 и 6. У пациентов со спинальной мышечной атрофией типа I и II ген NAIP отсутствует в 12–18% случаев. Известно, что протяженные делеции, захватывающие оба гена NAIP и SMN1, существенно повышают риск развития тяжелой формы спинальной мышечной атрофии.

Сравнительный анализ частот гомозигот по делеции гена SMN1 среди пациентов с СМА показывает, что высокий уровень делеций в этом гене характерен для больных СМА Северо-Западного региона России так же, как и для пациентов со СМА Евразии (Глотов А.С. и др., 2001). Рядом зарубежных авторов показано, что в 30% случаев мутации в гене SMN1 являются результатом конверсионных преобразований, т.е. возникают еще в мейозе. Конверсионные преобразования достаточно трудно идентифицировать, и нередко при образовании таких *химерных генов* результаты исследований интерпретируются как делеции, хотя фактически они являются продуктом конверсии (*внутригенных перемещений фрагментов ДНК*).

Учитывая значительную клиническую гетерогенность СМА, молекулярная диагностика заболевания должна быть особенно

тщательной. Важно проводить анализ не только на наличие простых делеций, но и конверсионных изменений, которые составляют до 30% мутационных повреждений региона SMN.

На основе собственных данных предложен алгоритм (рис. 11.10) диагностики СМА с учетом анализа конверсий. Алгоритм включает следующие этапы:

1. ПЦР-анализ экзонов 7-го и 8-го генов SMN1 и SMN2 образцов ДНК пробанда и его родственников.

2. SSCP и ПДРФ-анализ ПЦР продуктов 7-го и 8-го экзонов генов SMN1 и SMN2.

3.а. Выявление гомозигот по делеции экзонов 7-го и 8-го генов SMN1. Если больной не является гомозиготой по данному типу делеции (но имеет делецию гена SMN1), то образец его ДНК анализируется на наличие конверсии.

3.б. — Выявление гетерозигот по делеции экзонов 7-го и 8-го генов SMN1. Если один из родителей не является гетерозиготой по этой делеции, то проводится генеалогический анализ, и ДНК-обследованию «подвергаются» другие родственники (бабушка, дедушка, братья и т.д.). Если в этой семье нет пробанда с делецией в гомозиготе экзонов 7-го и 8-го генов SMN1, то для таких родственников также проводится анализ конверсий.

— Подтверждение «носительства» СМА.

4. Подтверждение диагноза у больных СМА.

В настоящий момент данная схема диагностики применяется не только для верификации диагноза СМА, но и для ПД данной патологии. При необходимости возможна косвенная диагностика — ПЦР-анализ динуклеотидных (CA) повторов ДНК локусов D5S125, D5S112, D5S127, ПДРФ-анализ с фланкирующими ДНК-зондами MU, 105–153RA, 153–6741GT.

11.7.7. Синдром Мартина–Белл

Синдром Мартина–Белл, или синдром ломкой X-хромосомы (СЛХ), является наиболее частым после синдрома Дауна наследственным заболеванием, приводящим к умственной отсталости. Данная патология встречается среди мужчин с частотой 1/4000. До недавнего времени диагностика заболевания основывалась на клиническом исследовании и цитогенетическом анализе участка q27.3 X хромосомы, включающего ломкий участок.

В 1991 г. был клонирован ген FMR1 (fragile-site mental retardation-1), содержащий ломкий участок FRAXA. Ген со-



Рис. 11.10. Алгоритм обследования семей высокого риска спинальной мышечной атрофии.

стоит из 17 экзонов и занимает около 38 тыс. п.о. геномной ДНК. В состав первого экзона гена FMR1 входит протяженный тринуклеотидный повтор CGG, расположенный в области CpG-островка. Основной причиной развития синдрома ломкой X-хромосомы является экспансия CGG-повтора в гене FMR1 (Verkerk A.J.M.H. et al., 1991). В норме этот повтор полиморфен и состоит из 6–54 триплетов. Размер аллелей, не имеющих фенотипического проявления и образующих так называемые *премутации*, находится в пределах от **52 до 200 повторов**. У пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы число повторов варьирует от **200 до 1300–1500 повторов**.

Таким образом, в зависимости от количества CGG-повторов X-хромосома может нести нормальный аллель, аллель с премутацией и аллель с полной мутацией (более 200 повторов). Полная мутация характеризуется аномальным метилированием промоторной области гена FMR1. Практическая задача молекулярного анализа заключается в определении того, какой из трех классов CGG-повторов присутствует в исследуемой X-хромосоме (нормальный, премутантный или мутантный).

Диагностику премутаций и мутаций обычно проводят методом блот-гибридизации по Саузерну. Для гибридизационного анализа используют стандартные протоколы рестрикции, электрофоретического разделения и переноса ДНК на мембрану. Двойная рестрикция геномной ДНК эндонуклеазами EcoRI и EagI дает возможность анализировать не только увеличение длины полиморфной последовательности, но и статус метилирования FRAXA локуса. Размер образующихся при рестрикции фрагментов оптимален для выявления премутаций (в том числе небольших по размеру) и полных мутаций.

Существует также альтернативный метод диагностики СЛХ у больных мужского пола по анализу состояния метилирования промоторной области гена FMR1, основанный на методе метилспецифической ПЦР (Стрельников В.В., Залетаев Д.В., 2004).

ПД у носительниц мутантного гена FMR1 может осуществляться на любом сроке беременности с использованием как прямого, так и косвенного методов (анализа сцепления по микросателлитным маркерам DXS548, FRAХAC1 и FRAХAC2). В случае неинформативности перечисленных маркеров или выявления микросателлитной нестабильности в обследуемой семье анализ ДНК плода проводится методом блот-гибридизации. В случае мужского пола плода возможно проведение диагностики методом метилчувствительной ПЦР на образцах ДНК из клеток амниотической жидкости, хориона или лимфоцитов периферической крови плода.

11.7.8. Миотоническая дистрофия Гофмана–Россолимо–Штейнерта–Батона

Миотоническая дистрофия Гофмана–Россолимо–Штейнерта–Батона (МД) наследуется по аутосомно-доминантному типу. Клиническая картина заболевания характеризуется крайней вариабельностью. У больных одновременно наблюдаются симптомы миотонии, миопатии и эндокринно-вегетативных расстройств с исключительным разнообразием клинических проявлений. Всего могут быть выделены три четко очерченные формы заболевания:

1. Мягкая форма МД, манифестирующая в среднем и старшем возрасте и характеризующаяся билатеральной катарактой и отсутствием или очень умеренными нервно-мышечными расстройствами.

2. Классическая форма МД начинается на 2–4-м десятилетии жизни с миотонии и прогрессирующей мышечной слабости. Позже присоединяются кардиомиопатия, атрофия гонад, эндокринные нарушения. Больные имеют характерный внешний вид вследствие особенностей строения костей черепа (*frontal balding*) и птоза. Психологические особенности и та или иная степень умственной отсталости также обычны.

3. Врожденная (конгенитальная) форма МД может проявляться еще внутриутробно в виде водянки плода, а постнатально — генерализованной гипотонией новорожденных, дыхательными нарушениями, затруднением сосания и глотания, высокой смертностью и тяжелой задержкой умственного и физического развития.

В большинстве регионов России распространенность МД не превышает 1 на 10000 новорожденных. Ген МД картирован в области 19q13.3. Продукт гена относится к семейству серин/треониновых протеинкиназ, родственных цАМФ-зависимым протеинкиназам, потому его обозначают как DM-протеинкиназный ген — DMPK. В 3'-нетранслируемой области гена DMPK локализованы *СТG-повторы*, которые в нормальной популяции отличаются высоким уровнем полиморфизма — количество копий варьирует от 5 до 37. Однако у больных миотонической дистрофией количество *триплетов* значительно больше и составляет *не менее 50 при наиболее мягких формах болезни, от 100 до 1000 у пациентов с классической формой МД, в то время как при врожденных формах заболевания может достигать трех тысяч повторов*. При МД отмечается также соматическая тканеспецифическая нестабильность СТG-повторов. Антиципация при миотонической дистрофии наблюдается практически в каждой семье — у потомков болезнь проявляется в более тяжелой форме, чем у самого пациента. Антиципация особенно выражена при передаче потомству по материнской линии. Так, формы врожденной МД встречаются почти исключительно у детей матерей, больных МД. Основой антиципации при атрофической миотонии является увеличение числа СТG-триплетов, происходящее в ряду поколений. *При этом амплификация СТG-области в материнском гаметогенезе происходит чаще, чем в отцовском.*

При молекулярной диагностике МД с использованием метода полимеразной цепной реакции, как правило, не удастся наблюдать продукта амплификации мутантного аллеля,

поскольку обычный ПЦР-анализ не позволяет амплифицировать участки СТG-повторов длиной больше 80–100 единиц. По результатам ПЦР у больных МД обнаруживается лишь по одному аллелю нормального размера. Проводя семейный анализ, в ряде случаев удается подтвердить или опровергнуть диагноз МД и провести досимптоматическую диагностику у родственников больных.

Для прямой диагностики МД – выявления экспансии СТG-повторов – необходимо в большинстве случаев проведение блот-гибридизации геномной ДНК с соответствующими зондами. Для каждого пациента рекомендуется проводить два независимых исследования – гибридизацию ДНК-зонда р5В1.4 с геномной ДНК, рестрицированной эндонуклеазой EcoR1 (позволяет выявить экспансии от 500 до 3000 СТG-повторов, но менее значительные изменения не обнаруживаются) и гибридизацию зонда р5В1.4 с ДНК, обработанной рестриктазой BamH1 (образуются более мелкие фрагменты ДНК, что позволяет выявить незначительные изменения их длины, но из-за выраженного соматического мозаицизма протяженные экспансии могут остаться незамеченными).

11.7.9. Хорея Гентингтона

Хорея Гентингтона (ХГ) – прогрессирующее аутосомно-доминантное нервно-мышечное заболевание, характеризующееся развитием хореических гиперкинезов и деменции. Симптомы заболевания обусловлены атрофией putamen и хвостатого ядра в головном мозге больных, связанной с преждевременной избирательной гибелью нейронов. В большинстве российских популяций распространенность ХГ составляет 1 на 10000. Отмечаются значительные различия в отношении возраста начала и тяжести течения заболевания. Даже внутри отдельных семей наблюдается четко выраженная клиническая гетерогенность. *При наследовании хорей Гентингтона по отцовской линии обычно проявляется эффект антиципации – нарастание тяжести течения и уменьшение возраста начала заболевания в ряду поколений.*

Ген IT15, динамические мутации в котором приводят к развитию хорей Гентингтона, экспрессируется во многих типах клеток. Он кодирует белок с молекулярной массой 348 кДа, *получивший название гентингтин*. В кодирующей области IT15 на расстоянии 18 кодонов ниже места начала трансляции

локализован полиморфный тринуклеотидный повтор (CAG)_n. Число CAG-повторов в гене IT15 в норме варьирует от 9 до 37, тогда как мутантные аллели пациентов с хореей Гентингтона имеют от 36 до 121 триплетов. Обнаружена обратная корреляция длины CAG-повтора с возрастом начала заболевания и прямая — со скоростью прогрессирования клинических симптомов. Изменение длины повтора при передаче потомкам объясняет большинство случаев антиципации.

Для мутантных аллелей в диапазоне 36–40 триплетов характерна неполная пенетрантность (McNeil S.M. et al., 1997). Описано значительное количество больных ХГ с таким числом повторов на мутантных аллелях. В то же время в этих же родословных могут встречаться клинически здоровые индивидуумы старше 70 лет. Аллели с числом CAG-повторов более 40 всегда связаны с развитием заболевания. Исследование состояния CAG-повторов методом ПЦР в семьях высокого риска позволяет проводить прямую молекулярную диагностику заболевания на любых стадиях онтогенеза, в том числе в до-симптоматический период. Вместе с тем важно отметить, что генетическое консультирование в семьях с ХГ (как и в случае других заболеваний с поздней манифестацией) сопряжено со сложностями этического характера (см. главу XIII). Учитывая доминантный тип наследования, риск получения мутантного гена для детей и сибсов больного ХГ составляет 50%. Естественно, что исключение носительства должно иметь положительное влияние на психологическое состояние лиц из группы риска. С другой стороны, отсутствие до настоящего времени эффективных методов лечения ХГ, выявление у пациента аллеля с экспансией, практически равнозначно приговору. В настоящее время принято проводить пресимптоматическое обследование только совершеннолетних лиц из группы риска при их непосредственном обращении за консультацией. Серьезным доводом в пользу досимптоматического обследования родственников больных является возможность профилактики заболевания в семьях высокого риска путем проведения ПД.

11.8. ПД МОНОГЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

Исторически сложилось, что такие заболевания, как муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна, гемофилия А, фенилке-

тонурия и некоторые другие, т.е. социально наиболее значимые, раньше других генных болезней стали предметом детального молекулярного анализа. Именно для этих заболеваний уже в конце 80-х годов XX века были не только идентифицированы соответствующие гены, но обнаружены и охарактеризованы различные, в том числе и мажорные мутации, значительно облегчающие их молекулярную диагностику. Более того, уже первые работы по практическому использованию этих данных показали, что каждое наследственное заболевание требует разработки специального, применимого только для него алгоритма ДНК-диагностики (Горбунова В.Н., Баранов В.С., 1997).

ПД моногенных болезней в Санкт-Петербурге началась с момента организации лаборатории ПД наследственных и врожденных заболеваний в НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта РАМН в 1987 г. В 1993 г. лаборатория получила статус Федерального медико-генетического центра. За это время в ФМГЦ были охарактеризованы популяционные частоты полиморфизмов генов и проанализированы спектры мутационных повреждений, отвечающих за развитие таких тяжелых заболеваний, как муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна, гемофилия А и В, фенилкетонурия, спинально-мышечная атрофия, миотоническая дистрофия, хорей Гентингтона, врожденная гиперплазия коры надпочечников, синдром Мартина–Белл и некоторые другие. Получение этой информации сделало реальной их ДНК-диагностику, в том числе и пренатальную. К концу 2004 г. в лаборатории с использованием молекулярных методов обследовано около 5000 семей (более 14 500 человек) с различными моногенными заболеваниями. С помощью разработанных в ФМГЦ алгоритмов в 703 семьях высокого риска моногенных наследственных заболеваний была проведена ПД, которая позволила предотвратить рождение 204 тяжело больных детей. Важно отметить, что в результате ПД около 500 семей получили реальную возможность иметь здорового ребенка.

На сегодняшний день в России молекулярная диагностика моногенных заболеваний проводится в достаточно ограниченном числе научно-исследовательских центров. К ним относятся Институт акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта РАМН (С.-Петербург); ИЭМ – Институт экспериментальной медицины РАМН (С.-Петербург); Педиатрическая медицин-

ская академия (С.-Петербург); Медико-генетический научный центр РАМН (Москва); Гематологический научный центр МЗ РФ (Москва); Томский институт медицинской генетики (Томск); НИИ неврологии РАМН (Москва); Государственный Новосибирский областной клинический диагностический центр (Новосибирск); Уфимский научный центр (Уфа). Спектры заболеваний, диагностируемых в вышеперечисленных центрах, частично перекрываются (см. главу V). При этом есть моногенные заболевания, которые диагностируются преимущественно или почти исключительно только в определенном центре. Благодаря развитию современной молекулярной биологии списки моногенных заболеваний, доступных ДНК-диагностике, постоянно расширяются.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кратко рассмотрены основные, социально значимые наследственные заболевания, важные для ПД, и типы их наследования (аутосомно-рецессивный, аутосомно-доминантный, X-сцепленный, с неменделевским типом наследования – болезни, вызванные особым типом мутаций, связанным с экспансией нуклеотидных повторов – динамическими мутациями). Подробно рассмотрены основные подходы, применяемые в ПД моногенных болезней. Последние включают прямую диагностику (идентификация мутаций непосредственно в гене-мишени) и косвенную диагностику (диагностика по наличию тесно сцепленных с мутацией молекулярных маркеров). Приведены основные принципы молекулярной диагностики до рождения, которые включают: своевременное обследование, правильную оценку риска, выбор оптимальных сроков ПД, качество получаемого биоптата, четкость рекомендаций после ПД. Особое внимание уделено проблемам точности молекулярной диагностики моногенных болезней у плода и возможным источникам ошибок. Дано краткое описание молекулярной природы, принципов и алгоритмов ПД девяти наиболее частых, социально значимых тяжелых наследственных заболеваний, диагностика которых в России впервые была разработана в НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта РАМН (Санкт-Петербург).

ГЛАВА XII. ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ

12.1. МЕДИКО-СОЦИАЛЬНЫЕ И ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ПРОФИЛАКТИКИ ВРОЖДЕННЫХ И НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В РФ

Профилактика ВНЗ – одно из ключевых направлений социальной политики, позволяющее регулировать демографические процессы и воздействовать на здоровье населения страны. Именно поэтому профилактика ВНЗ должна всегда оставаться в сфере ответственности государства. Подобная миссия, в свою очередь, требует четкого мониторинга ситуации, разработки комплекса мер, направленных на устранение негативных тенденций в этой важной социальной области. Сложившаяся на сегодняшний день в России опасная демографическая ситуация серьезно усугубляет и без того трудное положение в сфере охраны здоровья населения вообще и профилактики ВНЗ в частности. Назрела настоятельная необходимость корректировки задач и планов системы здравоохранения, его адекватного финансового обеспечения. Не секрет, что при ныне существующем финансировании здравоохранения государство не в состоянии выполнить обязательства по предоставлению населению гарантированного минимума услуг, в том числе и в сфере профилактики ВНЗ.

Статистические данные свидетельствуют о том, что в течение последних нескольких лет наблюдается прогрессивное снижение численности населения. В такой ситуации важно состояние здоровья каждого родившегося младенца. С экономической точки зрения выгоднее заботиться о здоровье будущего, еще не рожденного поколения, чем бороться за здоровье старшего поколения, обремененного грузом болезней, растущим пропорционально возрасту. Это, естественно, не означает свертывания уже существующих социальных программ, но указывает на важность всемерной поддержки госу-

дарством профилактической медицины — медицины здорового человека.

Чтобы определить пути улучшения здоровья будущих поколений, нужно выяснить факторы, влияющие на здоровье новорожденных и детей младшего возраста в настоящее время. Прежде всего, обращает на себя внимание повышение случаев детской инвалидности, ведущее место в которой принадлежит ВНЗ. Негативная тенденция к увеличению генных и хромосомных болезней особенно отчетливо прослеживается в наши дни (Вельтищев Ю.Е., Новиков П.В., 2002). Причинами роста ВНЗ являются: ухудшение экологической обстановки и ее неблагоприятного воздействия на человека (1), достаточно напряженная социально-экономическая обстановка в стране (2), рост генетического груза в популяции, обусловленный отчасти определенными успехами современной медицины (3).

Относительный вклад этих факторов в возникновение ВПР на сегодняшний день не выяснен. Согласно данным разных авторов на долю генетически обусловленных ВПР приходится 20–30% ВНЗ, на долю мультифакториальных — 30–40%, экзогенных (тератогенных) факторов 2–5%, факторов неясной этиологии 25–50% (Бочков Н.П., 1997).

Таким образом, профилактика ВНЗ может проводиться как путем снижения числа наследственных болезней, так и путем уменьшения повреждающего действия экзогенных факторов на плод. Естественно, что воздействие на экологическую обстановку — процесс сложный и пока все еще малоэффективный. Многолетние попытки каким-то образом уменьшить повреждающее действие факторов внешней среды на плод человека разочаровывают (см. главы IV, V). Значительно более эффективным является алгоритм профилактики ВНЗ, разработанный и широко используемый в медицинской генетике. Его основными составляющими являются пренатальная профилактика и пренатальная диагностика (см. главу I). В настоящее время эти подходы с успехом применяются во всем мире. Достаточно широко они используются и в нашей стране.

Тем не менее, несмотря на все усилия, согласно статистическим данным в 2000 г. в Российской Федерации родилось 1266,8 тыс. детей, из них уже больными или заболели вскоре после родов — 474,1 тыс. человек, что составляет 38% от чис-

ла всех детей, родившихся живыми. Одной из ведущих причин заболеваемости новорожденных оказались врожденные аномалии. Так, в 2000 г. новорожденных с таким диагнозом родилось 36,7 тыс., что составляет 2,9% от числа родившихся живыми или 7,7% от числа всех родившихся больными или заболевших в период новорожденности. До возраста одного года в 2000 г. умерло 19 286 человек, из них вследствие врожденных аномалий (пороков развития), деформаций и хромосомных нарушений – 4460 детей, что составляет 23,13% от общего количества умерших детей. В том же году в России было зарегистрировано 554,9 тыс. детей-инвалидов, врожденные аномалии (пороки развития), деформации и хромосомные нарушения были причинами инвалидности у 105,1 тыс. детей, что составляет 18,9% от общего числа детей-инвалидов (Здравоохранение в России, 2001).

Согласно данным О.П.Романенко (2002), состояние здоровья новорожденных детей в России внушает серьезные опасения. Так, в структуре перинатальной смертности наследственные заболевания и врожденные пороки развития составляют около 33–37%. По данным «Государственного доклада о состоянии здоровья населения РФ в 2000 году», смертность в группе детей от 0 до 14 лет снизилась практически от всех причин, кроме смертности от врожденных аномалий, травм и отравлений.

Среди причин детской инвалидности генетически обусловленные заболевания, в том числе и хромосомные аномалии, достигают 40% и прочно занимают первое место (Романенко О.П., 2002).

На сегодняшний день основное направление в области охраны репродуктивного здоровья в нашей стране – это политика планирования семьи и состояния репродуктивного здоровья населения. Именно эти направления регламентируются соответствующими законодательными актами. Единой государственной, законодательно обоснованной стратегии снижения генетического груза населения страны путем активной профилактики наследственных и врожденных болезней в России не существует. Отчасти вопросы генетического здоровья населения рассматриваются в приказах Министерства здравоохранения РФ, регламентирующих работу медико-генетической службы.

Согласно статье 15 Семейного кодекса Российской Федерации: «Медицинское обследование лиц, вступающих в брак,

а также консультирование по медико-генетическим вопросам и вопросам планирования семьи проводятся учреждениями государственной и муниципальной системы здравоохранения по месту их жительства бесплатно и только с согласия лиц, вступающих в брак». На сегодняшний день правами, закрепленными этой статьей, будущие супруги пользуются крайне редко, тогда как аналогичные процедуры в западных странах – это распространенная практика.

В России весь комплекс мер по выявлению, профилактике и лечению ВНЗ осуществляется с помощью медико-генетической службы (МГС), законодательной основой которой является Приказ Минздрава РФ №316 от 30 декабря 1993 г.

Согласно этому приказу, принцип структуры МГС – территориальный, основанный на создании и развитии материальных, кадровых и финансовых ресурсов здравоохранения для обеспечения гарантируемых видов медико-генетической помощи семьям,отягощенным наследственной и врожденной патологией. В соответствии с территориальным принципом организации МГС выделяется четыре уровня учреждений медико-генетической помощи населению: районный (городской), региональный (областной, краевой, республиканский), межрегиональный и федеральный уровни. Обязанности между учреждениями распределены таким образом, чтобы обеспечить «максимальное приближение МГС к месту жительства обслуживаемых контингентов населения». Задачами районного (городского) уровня являются «выявление семей, отягощенных наследственной и другой патологией, их учет и направление в региональное медико-генетическое учреждение, диспансерное наблюдение за лицами с выявленной патологией, распространение медико-генетических знаний среди врачей, среднего медперсонала и населения района».

На региональном уровне создается как самостоятельное лечебно-профилактическое учреждение (ЛПУ) или в составе другого ЛПУ медико-генетическая консультация (МГК). МГК объединяет на административной или функциональной основе всех специалистов-генетиков других учреждений. МГК предоставляет населению следующие виды медико-генетической помощи (МГП):

- медико-генетическое консультирование семей и больных с наследственной и врожденной патологией;

- пренатальный скрининг беременных на распространенные хромосомные болезни и врожденные пороки развития ЦНС;
- пренатальную диагностику распространенных наследственных и врожденных болезней;
- селективный скрининг семей и больных на наследственные болезни обмена;
- направление семей и больных со сложными случаями патологии в межрегиональную МГК или федеральный МГЦ для уточнения диагноза и генетического консультирования;
- ведение территориального регистра семей и больных с наследственной и врожденной патологией и их диспансерное наблюдение;
- пропаганда медико-генетических знаний среди населения.

Межрегиональный уровень оказания МГП — это некое промежуточное звено. МГК этого уровня выполняют контрольные функции в отношении учреждений своего региона, обследуют больных по направлению учреждений регионального уровня и при необходимости направляют их в МГЦ федерального уровня.

На базе ведущих НИИ и клиник создаются федеральные медико-генетические центры (ФМГЦ), в том числе специализированные. В их задачи входит:

- консультирование сложных случаев патологии, подтверждающая диагностика сложных и редких случаев наследственных болезней;
- разработка, апробация и внедрение новых методов диагностики, лечения и реабилитации, подготовка и повышение квалификации специалистов медико-генетических учреждений путем организации стажировки на рабочем месте;
- осуществление контроля качества работы нижестоящих медико-генетических учреждений;
- ведение регионального регистра семей и больных с редкой наследственной патологией;
- разработка научно-практических программ по заказам Минздрава или отдельных территорий.

В городах, где расположены региональные МГЦ и ФМГЦ, последние помимо своих непосредственных обязанностей

выполняют так же функции МГК. В приказе приведен перечень ФМГЦ. Четыре ФМГЦ находятся в Москве, один — в Томске и один в Санкт-Петербурге (НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта РАМН).

Уже более 10 лет в стране сформирована и действует эта схема оказания медико-генетической помощи населению. В дополнение к ней 28.12.2000 г. был издан Приказ Минздрава РФ №457 «О совершенствовании пренатальной диагностики в профилактике наследственных и врожденных заболеваний у детей», который определяет и уточняет медицинские аспекты пренатального скрининга.

Предусмотренные в этих нормативных актах меры по профилактике рождения детей с наследственной и врожденной патологией позволяют существенно снизить частоту наследственных заболеваний, но только при условии четкого выполнения всех этапов, всех алгоритмов МГС.

Что же реально получается на практике? Протокол стандартного обследования будущих родителей закреплен в медицинской документации, но много ли супружеских пар проходят подобное исследование? Как показывает наш опыт, медико-генетическую консультацию получают те, кто знает или подозревает у себя наличие наследственного заболевания и обеспокоен состоянием здоровья будущего ребенка (см. главу V). Те же, кто уверен в своем здоровье, обращаются в женскую консультацию уже по факту беременности. Если же супруги обратились в поликлинику по месту прописки, то врачи, как правило, не направляют их на медико-генетическое консультирование без веских причин (отягощенный анамнез или наличие близких родственников с подобной патологией). Естественно, что участковые врачи, да и врачи частной практики крайне редко имеют представление о современных возможностях медико-генетической службы. Генетические исследования проводятся только в условиях специализированных лабораторий ФМГЦ, которые, как правило, находятся в крупных городах.

Эффективность прекоцепционной профилактики и ПД основаны на достаточно большом количестве обращений (см. главу I). Чтобы этот алгоритм выполнялся, важно, чтобы сами родители были убеждены в необходимости обращения на медико-генетическое консультирование до наступления беременности, а также чтобы врачи женских консультаций

и центров планирования семьи имели представление о реальном состоянии диагностики наследственных патологий и направляли бы супругов для проведения генетического обследования. В этой связи необходимо предпринимать меры по повышению медицинской грамотности населения, равно как и повышению профессионального уровня врачей. Важной проблемой проведения таких упреждающих диагностических мероприятий является хорошая осведомленность врачей о необходимости медико-генетического консультирования до беременности, а также о сроках и условиях, необходимых для проведения такой диагностики во время беременности (главы X, XI).

В результате анализа основных документов, регламентирующих деятельность медико-генетической службы, становится очевидным, *что система профилактики ВПР в России существует, но ее эффективной работе мешает ряд проблем организационного и управленческого характера.* Во-первых, во всех этих документах отсутствует финансовое обоснование деятельности подразделений службы ПД. Если есть упоминание о формировании того или иного центра за счет федерального бюджета или бюджета субъекта федерации, то нет ни одного упоминания о финансировании текущей деятельности ее составляющих. До 2000 г. частичное финансирование всей службы ПД России осуществлялось за счет средств Российского фонда «Дети-инвалиды», которое, к сожалению, было полностью прекращено.

Некоторые функции были возложены на уже существующие структуры без увеличения штата, дополнительного финансирования или поставок дополнительного оборудования. В результате выполнять свои функции в полном объеме многие подразделения МГС просто не в состоянии. Крайне низкие ставки заработной платы врачей службы ПД, особенно в ФМГЦ, привели к тому, что большая часть услуг этих центров стали платными. Стали появляться многочисленные коммерческие структуры и центры для оказания платных услуг по различным составляющим ПД (УЗ, БС, лабораторная диагностика). Эти услуги зачастую не только не по карману пациенту, но и осуществляются лицами, не прошедшими специальную профессиональную подготовку и не имеющими достаточного опыта работы в области ПД наследственных болезней.

Таким образом, финансирование программ профилактики ВНЗ изначально не планировалось за счет бюджетных средств государства. Передача этих полномочий на места, их финансирование из муниципальных и региональных средств явились главными причинами их территориальной, методической и концептуальной разобщенности, что, в конечном счете, привело к дезорганизации всей службы профилактики ВНЗ в России. Из раздела гарантированных социальных завоеваний ПД все больше скатывается в область частного предпринимательства. Вместо четких, отработанных алгоритмов, служба ПД на местах нередко подменяется лишь ее отдельными составляющими, чаще всего ультразвуковой диагностикой. Отсутствие четких взаимодействий всех уровней МГС, недостаточная осведомленность врачей и населения о возможностях ПД, высокая стоимость услуг ПД в частных лабораториях и центрах способствуют еще большей драматичности общей ситуации ПД ВНЗ в стране. *Единственный разумный выход – перевести всю службу ПД ВНЗ на целевое бюджетное финансирование с одновременным существенным увеличением зарплаты сотрудников федеральных лабораторий и центров, занятых ПД.* Не исключен и другой вариант, практикуемый во многих западных странах – *перевод всей службы ПД ВНЗ в раздел обязательного медицинского страхования (ОМС).* И в том, и в другом случае потребуются большие денежные вложения и достаточно длительное время, чтобы восстановить эффективность работы службы ПД на местах.

12.2. ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ СЛУЖБЫ ПД В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

Служба ПД в Санкт-Петербурге (Ленинграде) появилась в 1987 г., когда в НИИАГ АМН СССР была создана лаборатория пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний. Именно здесь были предложены собственные оригинальные методы получения плодного материала в любые сроки беременности, разработаны эффективные и экономичные методы цитогенетического и молекулярного анализа с целью ПД хромосомных и генных болезней, налажены и внедрены в практику методы биохимического скрининга беременных.

В течение этих лет лаборатория пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний НИИАГ

им. Д.О.Отта РАМН была единственным центром ПД наследственных и врожденных болезней не только в Санкт-Петербурге, но и во всем Северо-Западном регионе России. Кроме того, лаборатория также осуществляет функции единственного в стране центра ПД муковисцидоза и, как уже упоминалось, является одним из федеральных медико-генетических центров РФ.

Важно отметить, что сложившаяся в течение многих лет *служба ПД в Санкт-Петербурге является многоуровневой и многоэтапной*. С начала своего становления служба ПД помимо лаборатории НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН включает Медико-генетический центр (сегодня – ГУЗ Диагностический центр (медико-генетический)) Санкт-Петербурга, все женские консультации, учреждения родовспоможения и кабинеты ультразвуковой диагностики.

Как видно на схеме (рис. 12.1), последние представляют собой *первый (базовый) уровень службы ПД*. В их обязанности входит осуществление трехкратного УЗ-скрининга всех беременных, а также забор образцов крови для проведения биохимического скрининга. Участие ЖК и других родовспомогательных учреждений 1-го уровня в службе ПД, их конкретные функции в каждом типе пренатального скрининга, а также рекомендации пациентам в зависимости от результатов скри-

3-й уровень – НИИАГ им. Д.О.Отта (Федеральный МГЦ)
Инвазивная ПД, МГ-консультирование
Выработка рекомендаций и тактики ведения беременности

2-й уровень – Диагностический МГЦ
УЗИ высокого уровня
Анализ АФП и ХГЧ (биохимический скрининг)
Инвазивная ПД (с 2005 г.)

Женские консультации
и другие родовспомогательные учреждения:
Трехкратный УЗ-скрининг
Забор проб крови для биохимического скрининга

Рис. 12.1. Структура службы ПД в Санкт-Петербурге (пояснения в тексте).

Таблица 12.1

**Функции ЖК и других родовспомогательных учреждений,
осуществляющих наблюдение за беременными
в Санкт-Петербурге, в пренатальной диагностике**

| Тип пренатального скрининга | Вид участия ЖК | Дополнительные мероприятия по обследованию |
|-----------------------------|--|--|
| Ультразвуковой | УЗИ 1-го уровня в соответствии со стандартными протоколами скринингового обследования в 10–14, 18–22 и 30–32 нед. беременности | <ul style="list-style-type: none"> • Специализированное или экспертное УЗИ в МГЦ • Инвазивная ПД в НИИАГ |
| Биохимический | Забор образцов крови для проведения БС в 15–17 нед. беременности | <ul style="list-style-type: none"> • Специализированное или экспертное УЗИ в МГЦ • Инвазивная ПД в НИИАГ |
| Иммунологический | Установление Rh-принадлежности крови беременной и ее супруга, контроль Rh-антител в случае повторной беременности у Rh(-) беременной Обследование на инфекции | <ul style="list-style-type: none"> • Диагностика наличия и степени тяжести гемолитической болезни плода (ГБ) • Внутриматочное переливание крови плоду при тяжелой степени ГБ |
| Молекулярный | Сбор семейного анамнеза для определения наличия в семье моногенной болезни | <ul style="list-style-type: none"> • ДНК-диагностика для установления информативности семьи • Молекулярная ПД |
| Цитогенетический | Сбор анамнестических данных о наличии в семье хромосомных болезней, привычного невынашивания беременности (ПНБ), детей с МВПР | <ul style="list-style-type: none"> • Кариотипирование супругов при ПНБ и бесплодии • Кариотипирование детей с МВПР • Цитогенетическая ПД |

нинга приведены в таблице 12.1. Естественно, что именно данный уровень в значительной мере определяет широту охвата беременных службой ПД и ее эффективность по выявлению ВНЗ и их своевременной профилактике. В соответствии с приведенным алгоритмом важнейшими функциями, осуществляемыми врачами ЖК после постановки беременной на учет, являются УЗ-скрининг 1-го уровня, забор образцов крови для БС и, при необходимости, уточнение Rh-фактора и уровня анти-Rh антител у женщины.

На втором уровне службы ПД, представленном Диагностическим центром (медико-генетическим), проводится УЗИ

2-го уровня, медико-генетическое консультирование, осуществляется биохимический скрининг. Согласно *Распоряжению №45 от 21.02.2005* с 2005 г. здесь начала проводиться инвазивная ПД хромосомных болезней, преимущественно у женщин возрастной группы 35–39 лет с высоким риском по БС.

У женщин групп высокого риска наследственной патологии, выявленных на 1-м и 2-м уровнях ПД, в лаборатории ПД НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН (*3-й уровень*) проводится инвазивная ПД хромосомных и генных болезней у плода, на основании которой вырабатываются рекомендации и тактика ведения беременности.

Взаимоотношения учреждений здравоохранения службы ПД г. Санкт-Петербурга представлены на рисунке 12.2.

Основные юридические документы, которыми сегодня руководствуется служба ПД Санкт-Петербурга, приведены в методическом пособии (Баранов В.С. и др., 2004).

При выявлении хромосомной или генной патологии у плода обязательным этапом ПД является консультирование женщины с предоставлением ей всей информации о прогнозе жизни ребенка в случае его рождения. Консультация основана на результатах лабораторных анализов и рекомендациях консилиума врачей: акушера-гинеколога, специалиста УЗД, генетика, неонатолога, других специалистов. Решение вопроса о сохранении или прерывании беременности женщина принимает самостоятельно. Конечно, ее решение во многом определяется качеством консультирования после диагностики (см. главы V, XIII).

Важным этапом ПД является верификация диагноза (ВД). В случае ВД хромосомной патологии плода необходимо не только подтвердить хромосомную аномалию, но и провести патоморфологическое изучение абортуса. При отсутствии общепринятой схемы комплексного исследования плодов с хромосомными аберрациями, учитывающей эмбриологические и цитогенетические особенности хориона, а также опыт, накопленный при исследовании сложных случаев, нами разработана собственная схема верификации пренатального диагноза. Схема предусматривает активное участие патоморфолога, врача-генетика, врача УЗД, цитогенетика и молекулярного биолога (Баранов В.С. и др., 2004).

В целом, эффективность ПД определяется частотой выявления плодов с ВПР, с хромосомными и генными болезнями. Наи-



Рис. 12.2. Взаимодействие учреждений здравоохранения Санкт-Петербурга при пренатальном обследовании беременных согласно Распоряжению №45 от 21.02.2005 Комитета по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга.

более эффективной по числу выявленных ВПР является УЗ-диагностика. Так, по данным Диагностического (медико-генетического) центра СПб (2003), удельный вес ВПР, впервые выявленных уже на 1-м уровне (ЖК), составляет 67–70% всех ВПР, диагностированных УЗ-методами. При этом ежегодно абсолютное число ВПР, выявляемых пренатально УЗ-методами, увеличивается в среднем на 10–15%. Так, если в 1998 г. их число составило 163, то в 2002 г. оно возросло до 260. В целом, в 2002 г. число пренатально выявленных УЗ-методами пороков достигло 9,6 на 1000 беременностей (36% от всех случаев рождения плодов и детей с пороками).

Чувствительность метода УЗ-диагностики по Санкт-Петербургу пока сравнительно невелика и оценивается ведущими специалистами этой службы ПД в 30%. Вместе с тем уже сегодня с помощью УЗД в Санкт-Петербурге можно выявить практически все ВПР, при которых следует рекомендовать прерывание беременности. УЗС особенно эффективен в диагностике ВПР центральной нервной системы, где по данным Диагностического (медико-генетического) Центра СПб ее эффективность составляет более 90%, а также множественных ВПР (66%). Наибольшие трудности представляет диагностика изолированных пороков сердца (10%), а также

дефектов лицевого черепа и дистальных отделов конечностей (15%). Важно подчеркнуть, что многие, особенно изолированные, пороки доступны оперативной коррекции. Поэтому до прерывания беременности плодом с ВПР женщине следует настоятельно рекомендовать консультацию врачей хирургов-неонатологов. Однако до принятия решения о постнатальной коррекции любых ВПР необходимо провести ПД с целью исключения хромосомных болезней.

Безусловно, в работе службы ПД Санкт-Петербурга существуют проблемы, часть которых связана с дефектами работы ее отдельных звеньев. Так, например, в 2002 году в городе пренатально выявлено 20 (31%) плодов с трисомией 21. При этом родилось 44 (69%) ребенка с СД, в том числе:

- 9 – у беременных старше 39 лет (5 – отказались от ПД, 4 – не проходили БС и не обследовались в ФМГЦ);
- 3 – у беременных 35–38 лет (1 – положительный результат БС (0,51%), 2 – не обследовались в ФМГЦ);
- 31 – у матерей моложе 35 лет (8 – риск от 0,3 до 0,5%, 9 – риск ниже популяционного, ложноотрицательные результаты, 14 не прошли БС и не обследовались в ФМГЦ).

В 2003 г. пренатально выявлено 15 плодов с трисомией 21 (28,3%) и родилось 38 детей с БД:

- 8 – у беременных старше 39 лет (6 – отказались от ПД, 2 – не обследовались в ФМГЦ);
- 7 – у беременных 35–38 лет (3 – отказались от ПД, 3 – не пришли на ПД, 1 – не обследовалась);
- 23 – у матерей моложе 35 лет (1 – отказалась от ПД, 2 – риск до 0,5%, 7 – без риска, 13 – не обследовались).

Таким образом, в 2002–2003 гг. половина матерей, родивших ребенка с болезнью Дауна, не прошли БС и не были обследованы в ФМГЦ по показаниям, требующим применения инвазивной ПД.

В 2004 г. на фоне прекращения финансирования программы скрининга МСБ и изменения возраста беременных как показания для инвазивной ПД с 39 лет на 35 лет и старше, было выявлено 35 плодов с трисомией 21 (49,3%) и родилось 36 детей с СД. Матери, родившие детей с СД в 2004 г., в абсолютном большинстве относились к группе низкого риска по рождению ребенка с хромосомной патологией, и, соответственно, у них не проводилось комплексного пренатального обследования, как это было принято в предыдущие годы.

В целом за 18 лет только лаборатории ПД НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН удалось предотвратить рождение около 500 детей с тяжелыми, неизлечимыми наследственными заболеваниями, в том числе более 100 с болезнью Дауна. В этой связи уместно отметить, что согласно официальным данным содержание только одного ребенка с болезнью Дауна обходится государству не менее 150 тыс. в год при средней продолжительности жизни такого больного 26 лет. Таким образом, только на больных с синдромом Дауна в результате ПД только одним ФМГЦ государству было сэкономлено свыше 3900 млн. рублей, что в десятки раз больше тех средств, которые были затрачены на всю службу ПД города за весь период существования службы ПД в Санкт-Петербурге.

12.3. РАСЧЕТ ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСНОЙ ПД С ЦЕЛЬЮ ПРОФИЛАКТИКИ ВРОЖДЕННЫХ И НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Оценка экономического эффекта и экономической эффективности – особый предмет для рассмотрения. Ниже будет приведена методика расчета стоимости отдельных услуг, которые формируют комплекс ПД, а затем на основе полученных данных проводится анализ экономической эффективности программ пренатального скрининга некоторых заболеваний.

Актуальность этого экономического обоснования определяется необходимостью разработки и апробации системы нормативов формирования ресурсной базы в целом на примере комплекса медицинских мероприятий в рамках одного из направлений предлагаемой федеральной целевой медико-социальной программы (ФЦМСП) (см. далее). Практическая значимость этих расчетов состоит в их использовании службой ПД; на основе нормативов Комитетом по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга планируются необходимые объемы ресурсов, в том числе и финансовые, для формирования бюджета города на следующий год. Данные расчеты уже были использованы при разработке проекта бюджета Санкт-Петербурга на 2004 г. и 2005 г.

Экономические расчеты производились по методике О.С.Коротеевой (2003) на основе «Инструкции по расчету стоимости медицинских услуг» от 10.11.1999 г. Данную ин-

струкцию необходимо применять в адаптированном виде, так как она разработана для ситуации, когда оцениваемые услуги являются основными в данной организации. В нашем случае услуги предоставляются клинической группой, которая состоит из сотрудников нескольких учреждений и в которую входят как врачи, так и научные сотрудники, работа выполняется на базе НИИАГ, а фактически должна осуществляться в рамках МГЦ. Таким образом, для расчета стоимости услуг необходимо внести в методику ряд корректив.

В соответствии с Приказом Минздрава России от 22.12.98 №374 «О введении классификатора «Простые медицинские услуги» рассматриваемые услуги относятся к разряду сложных, однако, согласно инструкции, «до разработки нормативов трудозатрат на каждую простую услугу, входящую в классификатор, расчеты затрат на услугу «посещение врача» осуществляются по действующим нормативам трудозатрат как на простую услугу».

«Под простой медицинской услугой, в соответствии с Приказом Минздрава России от 22.12.98 №374, понимается неделимая медицинская услуга, имеющая законченное, самостоятельное лечебное или диагностическое значение. В данной инструкции к простым услугам отнесены услуги поликлиники, оперативные вмешательства, а также посещения врача».

Согласно инструкции, расчет стоимости простой медицинской услуги (C) осуществляется по формуле:

$$C = C_n + C_k = Z_r + H_z + M + I + O + П,$$

где C_n – прямые расходы, C_k – косвенные расходы, Z_r – расходы на оплату труда, H_z – начисления на оплату труда, M – расходы на медикаменты, перевязочные средства и пр., I – износ мягкого инвентаря, O – износ оборудования, $П$ – прочие расходы.

К прямым расходам относят затраты, которые непосредственно связаны с медицинской услугой и потребляются в процессе ее оказания:

- оплата труда основного персонала;
- начисления на оплату труда основного персонала;
- материальные затраты, потребляемые в процессе оказания медицинской услуги полностью (медикаменты, перевязочные средства, продукты питания, одноразовые медицинские принадлежности и др.);
- износ мягкого инвентаря по основным подразделениям;

- износ медицинского и прочего оборудования, используемого непосредственно в лечебно-диагностическом процессе.

К *косвенным расходам* относят затраты, которые необходимы для обеспечения деятельности учреждения, но не потребляются непосредственно в процессе оказания медицинской услуги:

- оплата труда общеучрежденческого персонала;
- начисления на оплату труда общеучрежденческого персонала;
- хозяйственные затраты (затраты на материалы и предметы для текущих хозяйственных целей, на канцелярские товары, инвентарь и оплату услуг, включая затраты на текущий ремонт и т.д.);
- затраты на командировки и служебные разъезды;
- износ мягкого инвентаря во вспомогательных подразделениях;
- амортизация (износ) зданий, сооружений и других основных фондов, непосредственно не связанных с оказанием медицинских услуг;
- прочие затраты.

Перечисленные косвенные затраты учитываются в себестоимости медицинских услуг через расчетные коэффициенты. Услуга «внутриматочные инвазивные вмешательства под УЗ-контролем с целью ПД наследственных и врожденных заболеваний» в зависимости от срока ее оказания делится на кордоцентез, хорион- или плацентобиопсию (см. главу IX). Услуга «анализ кариотипа плода» является логическим продолжением услуги «внутриматочные инвазивные вмешательства под УЗ-контролем с целью пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний». Первая процедура подразумевает забор материала, а вторая — его обработку. Поэтому анализ кариотипа также делится на две части: анализ кариотипа плода по лимфоцитам пуповинной крови и анализ кариотипа плода по клеткам хориона или плаценты.

В таблице 12.2 представлены результаты расчетов стоимости услуг, оказываемых в лаборатории пренатальной диагностики НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН. В преискуранте НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН для жителей Санкт-Петербурга на вышеуказанные услуги в 2002 г. были установлены цены в размере 1000 руб.

Таблица 12.2

**Стоимость услуг, оказываемых в лаборатории пренатальной
диагностики НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН**

| Вид услуги | Стоимость услуги, руб. |
|---|------------------------|
| 1. Внутриматочные инвазивные вмешательства под УЗ-контролем с целью пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний | |
| – кордоцентез | 2005,46 |
| – хорион- или плацентобиопсия | 1618,46 |
| 2. Анализ кариотипа плода | |
| – анализ кариотипа плода по лимфоцитам пуповинной крови | 1937,18 |
| – анализ кариотипа плода по клеткам хориона или плаценты | 1849,67 |

Из данных таблицы 12.3. видно, что ни одна из рассматриваемых нами услуг не оплачивается пациентами на 100%. Таким образом, доплату за оказанные услуги должен осуществлять городской МГЦ из средств, перечисленных из городского бюджета. Исходя из нормативов использования рабочего времени по штатному расписанию, в 2002 г. следовало выполнить не более 600 операций (фактически это число намного больше – 897). Кордоцентез составляет около 16% оказываемых услуг. Следовательно, в год должно оказываться около 96 услуг «кордоцентез» и 504 единиц услуг «хорион- или плацентобиопсия».

Следовательно, ДЦ (МГ) Санкт-Петербурга в 2002 г. должен был финансировать осуществление ПД при полной нагрузке (а фактически превышает нормативный показатель числа инвазивных ПД) в размере около 924 тыс. руб. В 2002 г. ДЦ (МГ) Санкт-Петербурга предоставил расходных материалов для ПД для НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН на 324 тыс. руб. Таким образом, дефицит финансирования ПД в 2002 г. составил около 600 тыс. руб. Рассчитанные нами цифры весьма приблизительны, так как соотношение кордоцентезов и хорион/плацентобиопсий непостоянно. Кроме того, все расчеты были произведены для нормативной загрузки, тогда как фактически число операций и анализов в год значительно превышает расчетную величину.

Далее, на основе произведенных расчетов мы рассчитаем окупаемость государственных вложений в ПД. Это необходи-

Таблица 12.3

Соотношение расчетной и фактической стоимости услуг, оказываемых в лаборатории пренатальной диагностики НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН в 2002 г.

| Вид услуги | Расчетная стоимость, руб. | Фактическая стоимость, руб. | Соотношение факт./расчет. стоимость |
|--|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| 1. Внутриматочные инвазивные вмешательства под УЗ-контролем с целью пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний | | | |
| – кордоцентез | 2005,46 | 1000,00 | 0,50 |
| – хорион- или плацентобиопсия | 1618,46 | 1000,00 | 0,62 |
| 2. Анализ кариотипа плода | | | |
| – анализ кариотипа плода по лимфоцитам пуповинной крови | 1937,18 | 1000,00 | 0,52 |
| – анализ кариотипа плода по клеткам хориона или плаценты | 1849,67 | 1000,00 | 0,54 |

Таблица 12.4

Расчетное финансирование услуг, оказываемых в лаборатории пренатальной диагностики НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН

| Вид услуги | Нормативное кол-во оказываемых услуг в год | Оплата пациентов за оказанные услуги за год, руб. | Оплата МГЦ за оказанные услуги за год, руб. |
|--|--|---|---|
| Кордоцентез | 96 | 96262,08 | 96262,08 |
| Хорион- или плацентобиопсия | 504 | 505736,38 | 309967,46 |
| Анализ кариотипа плода по лимфоцитам пуповинной крови | 96 | 96704,03 | 89265,25 |
| Анализ кариотипа плода по клеткам хориона или плаценты | 504 | 503406,19 | 428827,49 |
| Итого | | 1202108,67 | 924322,29 |

мо для оценки и формирования объема ресурсов, которые нужны для реализации профилактической программы в целом.

Для того чтобы рассчитать экономическую эффективность ПД, необходимо определить сумму затрат на проведе-

ние диагностических мероприятий. Сейчас мы ставим себе цель рассчитать стоимость проведения ПД в 2002 г. исходя из отчетов о результатах деятельности лаборатории ПД НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН. Комплекс мероприятий, входящих в скрининговые программы, также был определен.

При подготовке данной главы за стоимость отдельной процедуры была принята реальная стоимость соответствующей услуги в НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН.

Основные практические результаты работы лаборатории за 2002 год следующие: обследовано 1203 индивидуума, в том числе 812 пренатально; выявлено 59 хромосомных нарушений (6,03%), в 49 случаях рекомендовано прерывание беременности:

- выявлено 20 плодов с трисомией 21;
- обследовано 242 семьи (1096 человек) высокого риска рождения детей с частыми моногенными болезнями, проведено 32 пренатальных диагностики и выявлено 7 плодов с наследственными болезнями.

В общей сложности за 2002 г. врачом-генетиком лаборатории пренатальной диагностики врожденных и наследственных болезней в НПО НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН выполнены 2982 медико-генетические консультации (из них 410 повторно), проконсультированы 244 пациентки, находящиеся на стационарном лечении в отделениях института. На консультацию по поводу инвазивных вмешательств к акушеру-гинекологу лаборатории направлена 341 пациентка. Врачом акушером-гинекологом лаборатории и сотрудниками Диагностического центра (медико-генетического) Санкт-Петербурга, прикомандированными для постоянной работы в лабораторию ПД НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН, были проконсультированы 3943 пациентки по направлению ЛПУ Санкт-Петербурга и выполнено 6139 ультразвуковых исследований. В операционной произведено 812 инвазивных вмешательств.

Основные результаты биохимического скрининга СД в Санкт-Петербурге за 2002 г. Всего обследовано 30356 человек, что составило 81% от общего количества беременных в Санкт-Петербурге в 2002 г. В группе риска хромосомной патологии оказалось 2053 пациенток (6,7% от общего числа обследованных). Из направленных 2053 человек в НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН на прием пришло около 30%, из которых 383

беременных были направлены на инвазивную пренатальную диагностику, а остальным рекомендовано УЗИ второго уровня.

В 2002 г. в Санкт-Петербурге родилось 44 ребенка с болезнью Дауна, 20 (31%) таких больных были выявлены пренатально (таким образом всего 64 ребенка с СД). Анализ динамики выявления СД у плода, начиная с 1997 г., показывает, что комплексный подход к отбору беременных женщин на инвазивную ПД с помощью ультразвукового и биохимического скринингов дает положительные результаты. Однако это требует точного соблюдения городского приказа по ПД, контроля за явкой беременных на консультацию в НИИАГ и непосредственно на инвазивную ПД.

Для ПД синдрома Дауна используется три типа скрининговых программ: биохимический скрининг (1), УЗ-скрининг (2) и цитогенетический скрининг (3). Первый подразумевает исследование образцов крови *всех беременных* в определенные сроки. Второй включает в себя трехкратное УЗИ в диагностические сроки. В результате этих скринингов формируются группы риска по хромосомной патологии у плода, которые в дальнейшем направляются на инвазивную ПД. Третий предполагает, что все беременные старше 35 лет, а также других групп с заведомо высоким риском (см. главу VI) направляются непосредственно на инвазивную ПД.

Как видно из рисунка 12.3, наибольший удельный вес в структуре показаний к инвазивной ПД имеют группы цитогенетического скрининга, следующий по численности – биохимический.

Выявляемость хромосомной патологии плода в зависимости от вида скрининговой системы и показаний к проведению инвазивной ПД представлена на рисунке 12.4. Наиболее эффективными видами скрининга являются УЗ и цитогенетический скрининги.

Основой пренатального скрининга СД в Санкт-Петербурге в 2002 г. являлся биохимический скрининг. Этим методом было обследовано 30356 беременных (81%). Стоимость обследования в рамках этой скринирующей системы составляет 300 руб. на человека. Таким образом, общая стоимость биохимического скрининга составила $30356 \times 300 = 9\ 106\ 800$ руб. В результате проведенных исследований была сформирована группа риска из 2053 человек, что составило 6,7% от числа



Рис. 12.3. Структура формирования группы риска для проведения инвазивной пренатальной диагностики в 2002 г. в Санкт-Петербурге.

обследованных. В соответствии с протоколом биохимического скрининга обследование проводится на базе территориальных женских консультаций, а сформированная группа риска направляется для дальнейшего уточнения диагноза в НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН. Из 2053 человек группы риска для дальнейшего обследования в лабораторию пренатальной диагностики обратилось только около 30% (616 пациенток).

Стоимость консультаций 616 человек в лаборатории пренатальной диагностики составляет $616 \times 350 = 215\ 600$ руб. После консультации 383 пациентки были направлены на инвазивную ПД (113 человек старше 39 лет и 270 – по результатам биохимического скрининга). 233 женщины были направлены для

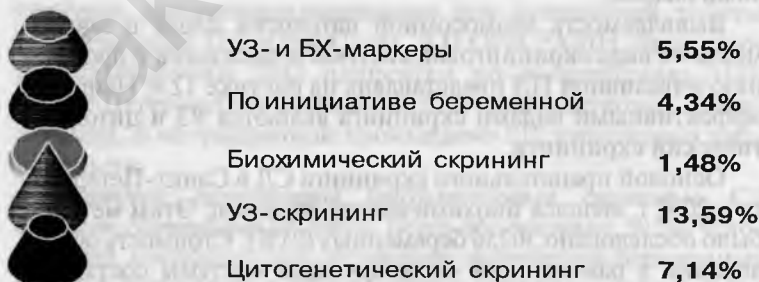


Рис. 12.4. Структура выявляемости хромосомной патологии плода в зависимости от вида пренатального скрининга в 2002 г. в Санкт-Петербурге.

выполнения УЗИ 2-го уровня. Из выполненных инвазивных вмешательств 61 составили кордоцентезы и 322 – хорион- или плацентобиопсии. Таким образом, стоимость этой части ПД составила $(61 \times 2005,46) + (322 \times 1618,46) = 643\,477,18$ руб. Стоимость УЗИ второго уровня для 233 человек составила $233 \times 600 = 139\,800$ руб.

По показаниям цитогенетического скрининга была сформирована группа риска из 303 пациенток (включая 113 после биохимического скрининга). Таким образом, стоимость консультаций у специалиста лаборатории пренатальной диагностики составила $(303 - 113) \times 350 = 66\,500$ руб., стоимость ПД в этом случае достигла $(303 - 113) \times 1618,46 = 307\,507,40$ руб.

Кроме того, в Санкт-Петербурге в соответствии с Приказом МЗ РФ №457 от 28.12.2000 г. осуществляется обязательное трехкратное скрининговое ультразвуковое исследование. Его стоимость составляет $(30356 + 190) \times (350 + 600 + 350) = 39\,709\,800$ руб.

С учетом цитогенетического анализа 897 образцов плодного материала для пренатального выявления в 2002 г. 20 плодов с трисомией 21 было затрачено 50 млн. 190 тыс. руб.

12.4. ФЕДЕРАЛЬНАЯ ЦЕЛЕВАЯ МЕДИКО-СОЦИАЛЬНАЯ ПРОГРАММА ПРОФИЛАКТИКИ ВРОЖДЕННЫХ И НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Применяемые в настоящее время алгоритмы ПД наследственных и врожденных заболеваний позволяют предотвратить рождение детей с грубыми пороками развития. Оптимальным вариантом решения проблем профилактики детской инвалидности врожденной и наследственной этиологии является разработка и внедрение соответствующей государственной федеральной целевой программы.

Программа должна носить управленческий характер. Ее задачи на федеральном уровне должны включать четкое описание существующей ситуации, определение конечных целей и комплекса мер, необходимых для их достижения. Подобная форма организации профилактики ВПР позволит аккумулировать все необходимые для достижения поставленных целей ресурсы, определить круг участников программы, распределить между ними функции и обязанности, проконтролировать результативность.

Существующие программы ориентированы на работу с инвалидами, на их лечение, социализацию, адаптацию и т.д.

При этом профилактический блок является лишь приложением других социальных программ и не получает должного развития. Между тем, акцент в решении проблемы инвалидности следует перенести именно на профилактику рождения детей с ВНЗ.

Таким образом, современный уровень ПД позволяет реально предотвратить рождение детей с ВНЗ. Затраты на подобного рода профилактические меры значительно ниже стоимости содержания детей-инвалидов в специализированных учреждениях. *Предлагаемая программа носит превентивный характер по отношению к существующим направлениям деятельности в области социальной политики в отношении инвалидов.* Преимущество профилактической концепции состоит в том, что при ее реализации одновременно решаются несколько задач:

- предупреждение рождения детей с врожденными пороками развития;
- снижение уровня инвалидности врожденной и наследственной этиологии;
- экономия бюджетных средств;
- повышение медицинской грамотности населения в области генетического здоровья населения;
- пропаганда здорового образа жизни в целом и в области генетического здоровья в частности;
- проведение кампании по сбору средств (фандрейзинга) на основе социального маркетинга.

Федеральная целевая программа как управленческий документ предполагает ряд обязательных характеристик: описание современного состояния проблемы, постановка целей и задач, определение механизмов и основных мер по их реализации, аккумуляция и перераспределение необходимых ресурсов, четкое указание источников финансирования. Все эти перечисленные компоненты образуют паспорт программы.

Цель программы: создание эффективной системы профилактики детской инвалидности экзогенной (врожденной) и эндогенной (наследственной) этиологии.

Задачи программы: профилактика детской инвалидности; повышение уровня медицинской грамотности населения в области генетического здоровья; проведение научных исследований в области профилактики врожденных и наследственных заболеваний. Решение этих задач – необходимое условие реализации комплекса профилактических мер всей программы.

Описание основных блоков и направлений программы графически представлено на рисунке 12.5. Весь комплекс мер разделен на три блока: медицинский, социальный и научно-исследовательский. *Первое направление* объединяет мероприятия, которые носят исключительно медицинский характер, т.е. все, что непосредственно связано с обследованиями, тестированием, врачебными приемами и так далее. В этот комплекс входит медико-генетическая, специальная медицинская и психологическая помощь беременным женщинам с выявленными ВНЗ у плода, больным с ВНЗ, семьям высокого риска по рождению детей с ВНЗ. Крайне важна работа психологов с теми, кто проходит молекулярное и цитогенетическое тестирование в рамках программы. Результаты генетического обследования трактуются врачом, в случае обнаружения болезни даются прогноз состояния здоровья ребенка после его рождения и, исходя из этого, рекомендации о продолжении беременности. Работа опытных психологов должна сопровождать все стадии обследования пациентов. ПД напрямую касается здоровья будущих детей и вынуждает пациентов принимать решение о судьбе своего ребенка (см. главу XIII). Каждая обследуемая семейная пара несет на себе определенный моральный груз и зачастую для принятия решения, правильного именно для данной семьи, необходима поддержка и профессиональная помощь не только врачей-генетиков, но и психологов.

Социальный блок представляет собой комплекс мер, направленный на работу с населением и пропаганду здорового образа жизни и генетического здоровья. В этот список также попадает и работа с семьями, которые имеют диагностированные заболевания и нуждаются в социальной адаптации. На первом этапе в этом направлении необходимо создание обществ таких семейных пар и привлечение к работе на территории России уже существующих подобных зарубежных ассоциаций. Естественно, что по мере роста благосостояния общества на этом этапе могут быть осуществлены и другие меры адаптации таких семей, например, полная или частичная оплата государством мероприятий по искусственному оплодотворению или суррогатному материнству. Подобные шаги возможны только в случае психологической готовности как будущих родителей, так и общества в целом. Комплекс социального маркетинга призван изменить взгляд общества на генетическое здоровье в целом, на генетические и хромо-



Рис. 12.5. Основные направления ФЦМСП.

сомные болезни в частности. Более подробно это направление будет рассмотрено в следующем параграфе.

И, наконец, *научно-исследовательский блок*. На сегодняшний день генетика — молодая наука, поэтому существует огромный потенциал новых разработок. На наш взгляд, было бы перспективно в рамках программы создать на базе уже существующих профильных научных центров и лабораторий отдельные группы, которые занималась бы анализом существующих и поиском новых методов профилактики ВНЗ. Такой подход позволит на основе новейших разработок снизить стоимость консультативно-диагностических мероприятий в рамках медицинского блока профилактических мер, следовательно, повысит эффективность всей программы в целом.

Еще одна важная проблема касается низкой грамотности населения, а зачастую и медицинского персонала, в вопросах генетического консультирования. Не каждая молодая супружеская пара знает о существовании Семейного кодекса РФ, который закрепляет за супругами право на бесплатное медико-генетическое обследование. Если в большинстве западных стран визит к врачу-генетику — это неотъемлемая часть подготовки к будущей беременности, то в нашей стране большинство будущих мам либо не слышали о таком специалисте, либо не считают необходимой такую консультацию. Все это свидетельствует о низкой осведомленности населения в вопросах генетического здоровья. Именно поэтому необходимо проводить работу по повышению уровня грамотности врачей и населения в области ПД.

Начинать подобную работу следует с медицинского персонала, который контактирует с будущими родителями. Именно на первом приеме у врача семья, планирующая иметь детей, должна узнать о важности и необходимости оценки генетического здоровья их будущего ребенка. Понятие генетического здоровья должно органично входить в концепцию здорового образа жизни. На сегодняшний день существует возможность формирования генетического паспорта каждого человека. Это направление деятельности особенно перспективно в свете развития нового направления профилактической медицины — предиктивной медицины, которая позволяет на основе генетического тестирования определить предрасположенность или риск развития многих заболеваний у человека еще до стадии клинического проявления болезни (см. главу XVI).

Возможность широкого использования генетической карты репродуктивного здоровья напрямую зависит от готовности врачей и всего общества к такому нововведению. В этом смысле профилактическая программа в части социального маркетинга может стать основой для внедрения целевой программы предиктивной (профилактической) медицины.

Одна из наиболее насущных проблем формирования профилактической программы — это финансирование всей системы ПД. Естественно, что ПД должна быть профинансирована в полном объеме, поэтому она требует бюджетного финансирования. Предполагается, что из регионального бюджета будут финансироваться начальные этапы программы (медико-генетическое консультирование, скринирующие программы), а некоторые виды специальной дорогостоящей и высокотехнологичной лабораторной диагностики будут оплачиваться из других источников, в частности, самими пациентами. Фандрейзинговая кампания в рамках социального маркетинга позволит привлечь дополнительные источники финансирования всех блоков профилактической программы. Государственная поддержка дает возможность охватить программами скрининга практически всех беременных, что, естественно, позволяет повысить эффективность ПД. Как уже отмечалось, в долгосрочной перспективе государству выгодно вкладывать деньги в профилактику детской инвалидности. Помимо социального аспекта такие инвестиции имеют еще и экономический эффект. Расчет экономической эффективности бюджетного финансирования ПД будет приведен в заключительном разделе этой главы.

Включение уже существующих программ скрининга в общую федеральную целевую программу позволит, по крайней мере, частично решить проблему финансирования. Такая организация позволит более четко разделить функции и денежные средства между исполнителями, наладить систему мониторинга и отчетности в системе медико-генетической службы.

Центральная часть профилактики детской инвалидности в рамках этой государственной программы — ПД. Ниже приводится расчет экономической эффективности ПД ВНЗ на примере скрининга синдрома Дауна. При этом предполагается, что эта диагностика уже финансируется за счет государственных средств.

Содержание одного ребенка с болезнью Дауна в специализированном учреждении обходится государству не менее 150 000 руб. в год, а средняя продолжительность жизни такого больного составляет около 26 лет. Всего на содержание ребенка с СД государство тратит около $150\,000 \times 26 = 3\,900\,000$ руб. Необходимо отметить, что при диагнозе СД у плода женщины, как правило, прерывают беременность. Таким образом, предотвращается рождение детей с тяжелыми неизлечимыми пороками развития. Только в 2002 г. с помощью ПД нам удалось предотвратить рождение 20 детей с синдромом Дауна. В случае их рождения государство затратило бы на их содержание около $20 \times 3\,900\,000 = 78\,000\,000$ руб. Следовательно, в 2002 г. при полном бюджетном финансировании ПД синдрома Дауна экономические показатели были бы следующими:

- экономический эффект: 78 млн. руб. – 50,19 млн. руб. = 27 млн. 810 тыс. руб.;
- экономическая эффективность: 78 млн. руб./50,19 млн. руб. = 1,55 или 155%.

Так как вложения носят разовый характер, а экономический эффект растянут во времени, то, строго говоря, 155% – это экономическая эффективность вложений за 26 лет. Поэтому, на наш взгляд, целесообразно рассчитать сроки окупаемости инвестированных средств.

Внедрение программы профилактики ВНЗ сделает возможным уже на второй год после начала ее реализации обследовать больше женщин (не 81%, а около 100%) и, следовательно, выявить внутриутробно около 90% детей с синдромом Дауна. Следовательно, начиная со второго года, экономический эффект программы составит 8 млн. 700 тыс. руб. При существующих тенденциях к медленному снижению стоимости скрининговых программ увеличение количества обследуемых не приведет к существенному увеличению размеров капитальных вложений. Если рассчитать окупаемость государственных вложений в ПД, исходя из приведенных выше данных, то мы получим оптимистический прогноз.

Нельзя, однако, игнорировать и пессимистический прогноз сроков окупаемости государственных вложений. Пессимистический прогноз исходит из допущения, что государственное финансирование не привело к увеличению эффективности скрининга, главным образом, вследствие его удорожания (увеличения штата медицинского персонала, удорожания

расходных материалов и пр.). При этом размер ежегодных бюджетных вложений возрастает на 1,5% в год.

В случае пессимистического прогноза период окупаемости государственных вложений составляет около 25 лет. Необходимо, однако, отметить, что развитие событий по этому сценарию означает, что государственная программа профилактики ВНЗ не оправдывает ожиданий и требует тщательного анализа и коррекции. Однако, и в этом случае срок окупаемости капитальных вложений меньше среднего срока жизни ребенка с синдромом Дауна. Это свидетельствует в пользу того, что сама по себе программа жизнеспособна, однако требует тщательной доработки и коррекции.

Важно подчеркнуть, что в качестве примера при расчете эффективности мы использовали результаты ПД только одной хромосомной болезни — синдрома Дауна. Между тем, при пренатальном кариотипировании, как показывает опыт ПД, диагностируется примерно столько же плодов и с другими хромосомными болезнями (см. главу X). Вполне реальна и ранняя антенатальная диагностика многих тяжелых генных болезней (см. главу XI). Кроме того, в результате обязательного компонента ПД, каким является УЗ скрининг, удастся выявить многочисленные ненаследственные врожденные пороки развития (ВПР), как некорректируемые, так и поддающиеся лечению в постнатальном периоде. В частности, УЗ скрининг позволяет выявлять до 80% всех ВПР, в том числе практически все ВПР, при которых прерывание беременности нецелесообразно (см. главу VIII). Как в случае хромосомных и генных болезней, так и в случае тяжелых ВПР пациентам рекомендуется прерывание беременности. Естественно, что в организационном и финансовом плане схема скрининга этих патологических состояний плода в целом аналогична таковой при СД (см. выше), т.е. составляет примерно 80% общих затрат (см. выше).

Таким образом, реальная экономическая эффективность рассматриваемого нами примера пренатального скрининга оказывается в несколько раз выше всех финансовых вложений, необходимых для проведения ПД. *Пренатальная диагностика — одна из наиболее рентабельных областей современной медицины!*

Предлагаемая целевая программа профилактики ВНЗ призвана решать как медицинские, так и социальные пробле-

мы. Основой профилактического комплекса должна оставаться государственная система оказания медико-генетической помощи населению. С нашей точки зрения, такая федеральная программа должна включать оба доминирующих блока: медицинский и социальный. Первый предполагает осуществление комплекса профилактических мер в области инвалидности, а второй – реализацию комплекса социального маркетинга. Основу предлагаемой Федеральной программы составляет принцип комплексного подхода к решению проблемы инвалидности врожденного и наследственного происхождения. Медицинский блок ориентирован на проведение профилактической кампании, что позволит существенно снизить рождаемость детей-инвалидов с врожденными некорректируемыми пороками.

Использование инструментов социального маркетинга позволит значительно повысить эффективность медицинских мер за счет продвижения идеи генетического здоровья и формирования в обществе новой концепции «здорового образа жизни».

Для того чтобы профилактические меры в любой области имели успех, прежде всего важно донести до людей идею о необходимости такой профилактики, о ее ценности для каждого человека. Таким образом, *одна из задач предлагаемой программы – это формирование в обществе осознанного использования медико-генетического консультирования как средства профилактики врожденных заболеваний.* Инструментом формирования осознанного отношения к здоровью будущего поколения должен стать социальный маркетинг, используемый государством в рамках ФЦМСП профилактики врожденных и наследственных заболеваний.

Конечная цель блока социального маркетинга в рамках ФЦМСП может быть определена как *формирование непосредственными участниками программы и соответствующими государственными органами ответственности за здоровье будущих поколений в обществе в целом и у каждого члена общества в отдельности.*

Основным источником финансирования ФЦМСП профилактики врожденных и наследственных заболеваний является государственный бюджет. Именно государство должно выступать в качестве основного субъекта социальной политики и проявлять заботу о социально незащищенных членах об-

щества. Вместе с тем, необходима диверсификация источников ресурсов данной программы, что может достигаться посредством социального маркетинга, привлекающего внимание к проблеме разных субъектов экономической деятельности. В ряду потенциальных источников финансирования на первом месте стоят фонды обязательного медицинского страхования (ОМС) различного уровня. Дети-инвалиды с некорректируемыми пороками развития нуждаются в серьезном лечении. Воспитание таких детей в семье является серьезной финансовой нагрузкой на фонд ОМС.

Важный источник ресурсов многих социальных программ — это средства спонсоров. Прежде всего, среди потенциальных спонсоров следует выделить предприятия, загрязняющие окружающую среду. Широкое обсуждение негативного влияния различных факторов на состояние генетического здоровья серьезно коснется и неблагополучных в этом плане регионов, а также предприятий, которые ухудшают экологическую обстановку. Соответственно, наилучший способ сохранения своего реноме для таких предприятий — стать спонсором программы, которая поможет в какой-то степени нивелировать негативный эффект засорения окружающей среды.

Реальным источником финансирования подобной профилактической программы могут быть и различные благотворительные организации и фонды как международные, так и российские. В целом, применение социального маркетинга в качестве инструмента фандрейзинговой деятельности позволит образовать в рамках программы специализированный Благотворительный фонд, который возьмет на себя функции координации спонсорских пожертвований. Необходимо подчеркнуть, что ведущая роль в финансировании федеральной целевой программы профилактики врожденных и наследственных заболеваний все же принадлежит государству, так как это направление медицинской науки — важнейший инструмент управления здоровьем населения, состояние которого в настоящее время внушает серьезные опасения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На фоне неблагоприятной демографической обстановки в стране, а также роста числа инвалидов с детства особенно важное значение приобретает профилактика ВНЗ. К сожалению, этой социальной проблеме пока не уделяется должного

внимания ни со стороны федерального правительства, ни на местах. Отсутствие планового целевого финансирования МГС, в том числе и службы ПД, чревато самыми серьезными социальными последствиями и потрясениями. Созданная по территориальному принципу многоуровневая организация МГС страны существует, но отсутствие профилактической направленности как генеральной линии всей современной медицины, четких приказов, регламентирующих службу ПД на всех ее уровнях и, конечно, достаточного целевого финансирования подрывают основы и делают малоэффективной эту одну из наиболее рентабельных и перспективных областей современной медицины. «Болезнь легче предупредить, чем лечить». ВНЗ, ответственные почти за 40% коек в детских стационарах, много легче диагностировать и предупредить еще пренатально, чем тратить огромные средства на лечение и реабилитацию тяжело больных детей. Единственный разумный выход из сложившейся сложной ситуации — обеспечить ПД ВНЗ целевым бюджетным финансированием, либо перевести эту службу в раздел обязательного медицинского страхования. В главе рассмотрены принципы организации ПД в таком мегаполисе, как Санкт-Петербург, где благодаря высокой централизации, четкому разделению функций на разных уровнях организации удалось достичь заметных успехов в предотвращении и профилактике ВНЗ. Специальный раздел посвящен расчетам экономической эффективности комплексной ПД, выполненным ученым-экономистом. Приведены результаты расчета средней стоимости услуг, связанных с БС, УЗИ, консультациями беременных, получением плодного материала и с лабораторными исследованиями. Отмечается высокая рентабельность службы ПД. На основании проведенного анализа предлагается вариант федеральной целевой медико-социальной программы профилактики ВНЗ. Ее цель — создание эффективной системы профилактики детской инвалидности экзогенной и эндогенной (наследственной) этиологии. Кратко рассмотрены три блока программы: медицинский, социальный и научно-исследовательский. Центральное место в профилактике детской инвалидности в рамках этой программы занимает ПД. Рассматриваются возможные дополнительные источники финансирования такой федеральной программы.

ГЛАВА XIII. ПРОБЛЕМА ЭТИКИ В ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Развитие биомедицинских технологий за последнюю четверть века принципиально изменило ситуацию для многих семей, имеющих повышенную вероятность рождения детей с врожденной и наследственной патологией. ПД стала применяться все шире, и ее возможности в профилактике наследственных и врожденных болезней быстро растут. Благодаря ультразвуковому и биохимическому скринингу, а также цитогенетическому и молекулярному анализу она стала реальной для сотен наследственных заболеваний и врожденных пороков развития.

Полученная в результате ПД информация должна быть направлена на помощь семье в выборе оптимального решения. В каждой конкретной семье оно может быть разным (продолжение беременности, подготовка к осложненным родам, к рождению ребенка, требующего специальной медицинской помощи, к прерыванию беременности). Вопросы этического характера поднимались во многих руководствах по клинической генетике (Мерфи Э.А., Чейз Г.А., 1979; Бочков Н.П., 1982, 1984; Воуэ А., 1995). Этические аспекты медико-генетических исследований, в том числе и касающиеся ПД, были предметом пристального внимания Всемирной организации здравоохранения (WHO, 1998) и неоднократно рассматривались в отечественной научной литературе (Бочков Н.П., 2001, 2002; Иванов В.И., Ижевская В.Л., 2002; Ижевская В.Л., 2003; Ижевская В.Л., Иванов В.И., 2004). Все эти этические аспекты и практические рекомендации основаны на общих принципах и правилах медицинской этики. В соответствии с Кодексом врачебной этики, принятом Всероссийским Пироговским съездом врачей 7 июня 1997 г., они должны служить руководством к исполнению при решении этических проблем медицинской генетики и ПД и в нашей стране (Кодекс, 1999).

В данной главе нам представлялось уместным суммировать современные представления по этическим проблемам ПД и рассмотреть состояние проблемы с позиции врача-генетика, непосредственно занятого медико-генетическим консультированием по вопросам ПД в условиях ФМГЦ.

13.1. ЭТИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ПД В ДОКУМЕНТАХ ВОЗ

Согласно рекомендациям ВОЗ «Международное соглашение об этических принципах в медицинской генетике и генетических технологиях» (WHO, 1998) при проведении медико-генетического консультирования следует заранее обсудить с семьей вероятную тактику в случае, если предполагаемый диагноз подтвердится. Генетическое консультирование проводится до инвазивного вмешательства и лабораторной диагностики. Соответственно, семья получает полную информацию и подписывает «Информированное согласие на процедуру». Ниже приводятся основные этические принципы ПД, изложенные в этом документе ВОЗ.

Этические принципы пренатальной диагностики (WHO, 1998)

- Генетическая помощь, включая ПД, должна оказываться тем, кто нуждается в ней по медицинским показаниям, независимо от уровня доходов и других условий (в том числе юридического статуса).
- ПД основывается на принципе добровольности. Будущие родители должны заранее принять собственное решение в отношении прерывания беременности, если по результатам ПД будет установлено, что ребенок будет болен.
- Диагноз плоду устанавливается до рождения независимо от личных взглядов родителей на проблему прерывания беременности. В некоторых случаях ПД проводится с целью подготовки семьи и медицинских служб к рождению ребенка с соответствующим заболеванием.
- ПД дает информацию родителям и медицинским специалистам только о состоянии здоровья самого плода. Недопустимо использование ПД для тестирования родителей (за исключением беременности в результате насилия или близкого кровного родства), выбора пола (за исключением наследственных заболеваний, сцепленных с полом).

- Медико-генетическое консультирование должно предшествовать проведению диагностической процедуры.
- Проведение ПД по медицинским показаниям должно быть приоритетным перед диагностикой только по обеспеченности матери состоянием плода.
- Врач должен предоставить женщине (супругам) все клинические сведения, известные по обсуждаемому заболеванию, включая сроки манифестации.
- После установления диагноза любое решение, принятое женщиной или супругами, должно быть воспринято с уважением и защищено в рамках прав семьи и законов, определяющих социальные и культурные принципы каждой страны. Только родители, ни в коем случае не медицинские работники, делают выбор в отношении судьбы плода.

Принципы консультирования перед пренатальной диагностикой (WHO, 1998)

Консультирование перед ПД должно включать в себя, как минимум, следующие положения и сведения, которые необходимо сообщить семье:

- Точное название и общую характеристику заболевания (заболеваний), которые могут быть выявлены при диагностике (информация не должна быть излишне детализирована). Помимо общей характеристики заболевания необходимо отметить то, как это состояние будет отражаться на будущем самого ребенка, его родителей и всех членов семьи.
- Возможности лечения заболевания после рождения ребенка и социальной поддержки, на которую могут рассчитывать родители.
- Описание вероятности (риска) того, что ребенок может быть болен. Риски могут быть выражены в процентах, пропорциях или словесно.
- Вероятности нежелательных результатов анализов и случайных находок.
- Возможные пути решения проблемы, если ребенок окажется больным. Например, донашивание беременности и дальнейшее воспитание ребенка в семье или помещение его в государственные учреждения, отказ и передача на усыновление, прерывание беременности, лечение плода во время беременности или сразу после рождения.

- Вероятность получения неоднозначных лабораторных или ультразвуковых данных.
- Необходимо учитывать, что большинство диагностируемых состояний плода не лечатся пренатально. Соответственно, информация о наличии заболевания не может помочь самому ребенку до его рождения.
- Никакие тесты не могут дать полной гарантии здоровья будущего ребенка, так как есть множество заболеваний, никак не проявляющих себя до рождения, кроме того, специалисты могут быть не информированы, что данная семья имеет риск по какому-то другому заболеванию, помимо того, в отношении которого проводится ПД.
- Риск проведения самой диагностической процедуры для матери и для плода.
- Проблемы немедицинского характера, если они есть (оплата диагностики самими родителями или за счет средств государственного финансирования).
- Информирование о том, что неинвазивные скринирующие программы, такие как биохимический скрининг, являются только первым этапом пренатального обследования и никогда не позволяют точно установить диагноз.
- Стоимость обследования и возможности компенсации расходов, если таковые имеются.
- Названия и адреса специальных организаций для людей с заболеванием, установленным у плода, групп поддержки и отдельных лиц, с которыми можно связаться, если консультирующиеся захотят этого.

13.2. ЭТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПД В ПРАКТИЧЕСКОЙ РАБОТЕ ВРАЧА-ГЕНЕТИКА

Вышеприведенные этические принципы и положения, регламентирующие медико-генетическое консультирование, в том числе и пренатальное, носят общий характер и при всей своей универсальности не могут предусмотреть всех организационных и клинических сложностей, с которыми постоянно приходится сталкиваться врачу-генетику. Естественно, что они не учитывают и быстро меняющиеся возможности самой ПД. Так, если в 90-х годах прошлого века молекулярно-генетический анализ, а вслед за ним и дородовая диагностика, были разработаны только для нескольких крайне тяжелых забо-

леваний с ограниченным сроком жизни больных (муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна и др.), то в настоящее время известна молекулярная основа и, соответственно, реальна ПД нескольких сотен наследственных заболеваний с различным характером течения и социальными последствиями (см. главу XI). При ультразвуковом исследовании определяются мельчайшие подробности анатомического строения плода и даже некоторые особенности его функционального статуса (см. главу VIII). Цитогенетический анализ, особенно в сочетании с его различными молекулярными модификациями (различные варианты FISH-метода), предоставляет уникальные возможности детального анализа кариотипа плода (см. главу X). При этом дальнейшее развитие ПД невозможно без постоянного совершенствования уже существующих этических принципов и их регулярной коррекции в зависимости от изменяющихся условий. Соответственно, перед специалистами и самими родителями все чаще возникают два основных вопроса этического характера:

- *при наличии методической возможности проводить или не проводить ПД конкретных состояний, риск которых в семье имеется, но заболевание не столь тяжелое?*
- *прерывать или не прерывать беременность при обнаружении некоторых видов патологии?*

Ответ далеко не очевиден, если речь идет о заболеваниях с умственной отсталостью различной степени, риском малигнизации ниже среднего (нейрофиброматоз, синдром Беквита–Видемана и др.). Однозначные рекомендации не могут быть даны при выявлении кариотипов плодов с числовыми и структурными абберациями половых хромосом, при обнаружении маркерных хромосом и других перестроек, при диагностике заболеваний, для которых уже имеются достаточно эффективные способы лечения (гемофилия, фенилкетонурия). Выявление при ультразвуковом исследовании некоторых пороков костной системы, пороков сердца, расщелин губы и/или неба и других аномалий, ведущих к многоэтапной хирургической коррекции, также требует значительной помощи семье в принятии решения о продолжении беременности. Необходим особый подход, если семья настроена провести родовую диагностику тяжелых наследственных заболеваний с поздними сроками манифестации (хорея Гентингтона, поликистоз почек взрослого типа и пр.).

Значимым является и срок беременности при решении вопроса о прерывании в случае поражения плода. Диагностика в I триместре допускает более строгие подходы. Подтверждение диагноза или неожиданное обнаружение патологии в конце второго или даже в III триместре не всегда может служить поводом для прерывания беременности.

По мнению ведущего английского генетика Питера Харпера (Harper P.S., 2003), критериями для проведения ПД являются следующие положения:

- *заболевание достаточно тяжелое и является основанием для прерывания беременности;*
- *лечение отсутствует или малоэффективно;*
- *семья согласна прервать беременность, если у плода подтвердится диагноз;*
- *имеются надежные лабораторные тесты для точной ПД заболевания;*
- *имеется высокий генетический риск при данной беременности.*

Необходимо отметить, что критерии ПД могут отличаться в разных странах и даже в разных регионах одной страны, значительно модифицироваться с течением времени по мере развития новых лечебных технологий. Медицинские рекомендации могут изменяться и в связи с реальными успехами фармакотерапии, развитием медицинских технологий и доступностью социальных программ. Это касается больных с фенилкетонурией (ФКУ), муковисцидозом, гемофилией и даже с синдромом Дауна. Перемены особенно заметны в экономически развитых государствах. В нашей стране за последние годы заметно изменилась ситуация для больных с ФКУ. До организации массового скрининга диагноз этого заболевания ставился слишком поздно. Соответственно, родители, воспитывающие больного ребенка со значительным снижением интеллекта, с готовностью шли на ПД этого заболевания при следующих беременностях. После внедрения массового скрининга на ФКУ и при доступности современных безфенилаланиновых гидролизатов появилась реальная возможность активной профилактики клинической манифестации этого заболевания. Многие дети, выявленные при неонатальном скрининге, строго соблюдающие диету и получающие в необходимом количестве белковые гидролизаты, имеют хорошие показатели нервно-психического развития и соматического здоровья. Их родители иногда отказываются от ПД, не

считая фенилкетонурию слишком тяжелым заболеванием. С другой стороны, решение одной проблемы (эффективная диетотерапия ФКУ) делает крайне актуальной другую – профилактику тератогенного воздействия материнского фенилаланина на плод (необходим перевод на низкофенилаланиновую диету на весь период беременности, включая подготовку к ней).

Отношение родителей к вероятной болезни будущего ребенка зависит от того, есть ли в семье уже кто-либо с этим заболеванием или же они столкнулись с этим впервые. При наличии тяжело больного ребенка в семье родители, консультирующиеся в отношении прогноза для следующих детей, крайне настороженно относятся даже к минимальному повторному риску. Наиболее спокойное отношение отмечено у родителей, если они сами имеют проблему, в отношении которой и определяется прогноз. Для глухих родителей рождение и воспитание слышащего ребенка является более проблематичным, чем появление на свет ребенка с глухотой. В обычной семье рождение глухого ребенка провоцирует длительный стресс, а при отсутствии профессиональной реабилитационной помощи оборачивается для ребенка задержкой нервно-психического и интеллектуального развития. Открытие центров раннего вмешательства, оказывающих реабилитационную помощь медико-социально-педагогического характера в самом раннем возрасте (от 0 до 3 лет) является существенным шагом к улучшению качества жизни многих детей с различной врожденной и наследственной патологией.

В процессе медико-генетического консультирования вопросы ПД должны быть обсуждены заранее, еще до наступления беременности. При составлении медико-генетического заключения необходимо не только оговорить возможность ПД для консультирующейся семьи, но и уточнить круг родственников лиц, которым подобная ПД также может быть показана. Проведение подобных консультаций уже во время беременности крайне нежелательно. Это не только объясняется реальным дефицитом времени, связанным со сроками беременности, но скорее тем, что большинство беременных женщин, их мужей и членов семьи во время беременности не могут объективно оценить все факторы «за» и «против» как самой процедуры, так и вероятных результатов ПД.

Широкое применение скринирующих программ приводит к тому, что беременная женщина может оказаться в группе

высокого риска врожденной и наследственной патологии у плода, когда предварительный риск, до проведения обследования, был совсем низким. В случае подтверждения диагноза такие семьи нуждаются в профессиональной психологической помощи, особенно, если срок беременности уже большой. Вероятность прерывания беременности при получении негативных результатов диагностики должна быть осознана консультирующейся семьей заранее — еще до проведения процедуры. В некоторых случаях, по религиозным или иным соображениям, семья не собирается прерывать беременность даже при тяжелом наследственном или врожденном заболевании будущего ребенка. Многое зависит от установок социальной группы или национальности, к которой принадлежат родители. В ряде семей доминируют личные мотивы. Одни пары готовы пойти на диагностическую процедуру и прервать беременность в случае нежеланного пола плода. Другие даже при высоком риске тяжелых наследственных или врожденных заболеваний не соглашаются на инвазивную диагностику, а после установления диагноза сомневаются в его достоверности и надеются на чудо.

Нежелание прерывать беременность не является поводом для отказа от проведения пренатальных исследований вообще. В таких случаях ПД следует рекомендовать с целью перехода от вероятностного прогноза к точному диагнозу или его отмене. Установление диагноза позволяет семье подготовиться к рождению ребенка с известными проблемами здоровья и заранее продумать и спланировать вместе со специалистами необходимые мероприятия медицинского и социального плана.

Важно информировать семью, что обнаружение некоторых ВПР и пренатальное установление диагноза при современных возможностях медицины еще не является обязательным поводом для прерывания беременности. Установленный диагноз и соответствующие особенности развития плода являются значимыми для определения тактики ведения родов и необходимости высокоспециализированной медицинской помощи новорожденному в первые дни и даже часы жизни. Продолжение беременности может быть оправдано при обнаружении некоторых врожденных пороков сердца, диафрагмальных грыж небольшого размера без смещения органов, случаев гастрошизиса при нахождении петель кишечника в амниотической полости без их ущемления, при амниоти-

ческих перетяжках, не деформирующих жизненно важные органы. Некоторые эмбриональные опухоли могут подвергаться резорбции и не определяться после рождения. Важно подчеркнуть, что возможность хирургической коррекции порока и других видов помощи должна обсуждаться только после исключения хромосомной патологии у плода.

В случаях установленных несбалансированных хромосомных aberrаций, открытых дефектов нервной трубки, некоторых нейродегенеративных заболеваний рекомендации для семьи должны быть довольно строгими. Другие состояния, включающие в себя соматические нарушения при нормальном уровне интеллекта без ограничения продолжительности жизни, требуют более дифференцированного подхода.

Таким образом, *этические аспекты ПД на современном этапе продолжают заслуживать столь же пристального внимания специалистов, как и вопросы методического, клинического и организационного усовершенствования этой службы.* Следует обратить внимание на то, что *нерешенность многих этических вопросов ПД объясняется не столько тем, что им не придают значения, а скорее тем, что ответы на них трудны и неоднозначны. Эволюция общества и стремительное развитие биомедицинских технологий, используемых в диагностической практике, выдвигает эти вопросы на передний план.*

К сожалению, до сих пор не существует международных документов, определяющих права самого плода. Специалисты в лучшем случае ссылаются на документы, определяющие права ребенка. Но при отсутствии общепризнанных критериев о начале жизни плода, независимой жизнеспособности ребенка вне материнского организма и других параметров, столь широкое применение этих правовых документов не совсем корректно. Соответственно, *необходимы новые международные правовые документы, определяющие права плода, а не только семьи.* Во всех странах с развитой службой ПД такие документы должны быть ратифицированы в первую очередь.

13.3. ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА И ЕВГЕНИКА

Поскольку конечный результат ПД — выявление и профилактика рождения детей с тяжелыми врожденными и наследственными заболеваниями, кажется очевидным, что ПД должна реально приводить к уменьшению генетического груза

в популяции. Однако реальная взаимосвязь ПД и евгеники в действительности не столь однозначна.

ПД ведет к селективному абортированию плодов, обладающих мутациями, приводящими к тяжелым заболеваниям. Учитывая тяжесть большинства аутосомно-рецессивных заболеваний и ограниченную продолжительность жизни индивидуумов, которые могли бы родиться без проведения ПД, можно считать, что их репродуктивный вклад в любом случае равен нулю. Генотипы самих родителей остаются неизменными и никак не зависят от диагностики. Соответственно, широко проводимые дородовые исследования с последующей элиминацией гомозиготных больных плодов могут изменять соотношение частот генотипов в популяции, но не оказывают заметного влияния на частоту генов. Для изменения частот встречаемости генов необходимо было бы элиминировать всех носителей патологических генов, что, конечно же, исключено. Следует, однако, обратить внимание на то, что при хорошо поставленной службе ПД все гетерозиготные носители мутантных генов имеют реальный шанс родить здорового ребенка. Соответственно, число больных гомозигот в популяции будет уменьшаться. Благоприятные социальные последствия такой позитивной евгеники очевидны. Так, благодаря правильно организованной службе ПД в ряде передовых стран Европы практически полностью удалось предотвратить рождение детей с болезнью Дауна, с открытыми дефектами нервной трубки и заметно сократить число детей с некоторыми наиболее частыми и тяжелыми моногенными болезнями (талассемия, муковисцидоз) (см. главы VII, X, XI). Как показывает мировой и отечественный опыт, вполне реально предотвратить рождение индивидов с тяжелыми заболеваниями, наследуемыми по аутосомно-доминантному типу, в том числе и с отсроченной манифестацией (хорея Гентингтона, врожденные миопатии).

Таким образом, ПД и элиминация больных плодов, проведенные по желанию родителей, способствуют снижению генетического груза популяции в целом. Все это дает основание рассматривать ПД как реальный путь развития современной позитивной евгеники. Усилия ПД, направленные на рождение здорового ребенка в конкретной семье высокого риска, в конечном счете, благоприятно сказываются на социальном и генетическом здоровье всего общества и человечества в целом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Этические аспекты продолжают оставаться важным, до сих пор до конца не разработанным разделом ПД. В настоящее время методическую и концептуальную основу для решения этических проблем ПД составляют положения документа Всемирной организации здравоохранения: «Международное соглашение об этических принципах в медицинской генетике и генетических технологиях» (ВНО, 1998). Приведены основные принципы и этические нормы медицинской генетики, которые необходимо соблюдать при проведении медико-генетического консультирования в службе ПД. Отмечено, что эти положения при всей своей универсальности носят общий характер. Они не могут и не должны предусматривать всех организационных и клинических сложностей, с которыми постоянно приходится сталкиваться врачу-генетику. Естественно, что они не учитывают и быстро меняющиеся возможности самой ПД. Если в 90-х годах прошлого века ПД была разработана только для некоторых тяжелых инвалидизирующих заболеваний, ограничивающих срок жизни больных, то в настоящее время ПД доступны практически все наследственные и врожденные заболевания. Это порождает новые, ранее неизвестные сложности для медико-генетического консультирования как в отношении спектра болезней, подлежащих ПД, так и в выработке врачебной тактики после ПД. Нерешенность многих этических вопросов ПД на современном этапе объясняется не столько тем, что им не придают значения, а скорее тем, что ответы на них трудны и неоднозначны. Между тем, эволюция общества и стремительное развитие биомедицинских технологий выдвигают эти вопросы на передний план. Этические аспекты ПД на современном этапе продолжают заслуживать столь же пристального внимания, как методические, клинические и организационные вопросы этой службы.

ПД способствует снижению генетического груза популяции в целом, что дает основание рассматривать ее как реальный и весьма эффективный раздел современной позитивной евгеники. Усилия ПД, направленные на рождение здорового ребенка в конкретной семье высокого риска, в конечном счете благоприятно сказываются на социальном и генетическом здоровье всего общества и человечества в целом.

ГЛАВА XIV. НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Прогресс любой науки, любого научного и практического направления определяется, в первую очередь, прогрессом соответствующих методов. В предыдущих главах уже были рассмотрены ставшие традиционными методы ультразвукового, цитогенетического, молекулярного и биохимического исследования плода, которые уже широко применяются службами ПД во всем мире, в том числе и в нашей стране. Большая практическая и социальная значимость ПД как основного способа профилактики врожденных и наследственных заболеваний является серьезным стимулом к разработке новых, более чувствительных, эффективных и менее травматичных методов анализа состояния плода.

В современной ПД таковыми являются:

- доимплантационная диагностика;
- метод комбинированной ПД хромосомных болезней в I триместре беременности;
- молекулярная диагностика хромосомных болезней;
- неинвазивная ПД по клеткам и ДНК плода в крови беременной;
- молекулярное кариотипирование.

14.1. ДОИМПЛАНТАЦИОННАЯ ДИАГНОСТИКА

Доимплантационная диагностика (ДД) появилась в 90-х годах прошлого века благодаря быстрому развитию методов вспомогательной репродукции, прежде всего методов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и микрометодов, приемлемых для анализа генома единичных клеток, таких как методы молекулярной цитогенетики (различные варианты FISH) и молекулярной генетики (варианты ПЦР) (Verlinsky Y., Kuliev A.M., 1993). В настоящее время список наследственных болезней, доступных доимплантационной диагностике,

включает не только многие моногенные (муковисцидоз, фенилкетонурия), но и различные хромосомные болезни. Спектр заболеваний, доступных для этого вида диагностики, в настоящее время насчитывает более 40 нозологий и включает все частые моногенные и хромосомные болезни (Verlinsky Y., Kuliev A.M., 2000). Уже к 2001 г. в мире было проведено более 2500 доимплантационных диагностик. После отбора морфологически неполноценных эмбрионов и трансплантации в матку реципиентов оставшихся зародышей в 500 случаях родились здоровые дети. В настоящее время число ДД в мире превысило 10 000 (Schwinger E., 2002; Kuliev A.M. et al., 2002). Эффективность ДД и ее объем в сочетании с прогрессом методов вспомогательных репродуктивных технологий быстро увеличиваются. Справедливости ради следует отметить, что ДД начинает постепенно внедряться и в России. В нашей стране она делает только первые шаги и проводится лишь в нескольких центрах вспомогательных репродуктивных технологий Москвы и Санкт-Петербурга. Причем и в этих центрах она пока ограничена только определением пола плода (планирование семьи и X-сцепленные заболевания), а также исключением хромосомных болезней (Бахарев В.А., 2004).

Материалом для ДД являются полярные тельца или отдельные бластомеры, полученные с помощью микроманипулятора от доимплантационных зародышей – продуктов экстракорпорального оплодотворения. В зависимости от исследуемого материала, ДД можно подразделить на преконцепционную (анализ полярных телец) и собственно доимплантационную (анализ бластомеров или клеток трофобласта) (Verlinsky Y., Kuliev A.M., 1993).

Диагностика с использованием полярных телец позволяет отбирать для оплодотворения ооциты, не несущие генных и геномных мутаций. **Основная проблема** – большая вероятность неточного прогноза о генотипе ооцита при тестировании только первого полярного тельца, в котором высока вероятность (50%) кроссинговера. Более точно определить наличие мутации можно только после завершения второго деления мейоза, т.е. по второму полярному тельцу, которое образуется уже после оплодотворения яйцеклетки.

Вторая проблема обусловлена особенностями применения молекулярно-генетических методов для диагностики единичной клетки. На результаты ПЦР могут повлиять различные

факторы, в частности, контаминация образца или условия проведения реакции. Поэтому предобработка материала яйцеклетки (зародыша) и постановка высокочувствительной ПЦР требуют большого опыта и специальных навыков.

Проблема цитогенетического анализа полярных телец заключается в невозможности применения традиционных методов анализа метафазных хромосом. Поэтому для этих целей обычно используют метод гибридизации *in situ* с флуоресцеинмеченными ДНК-зондами, специфичными к участкам отдельных хромосом (метод FISH). В последние годы разработаны и апробированы методы приготовления хромосом из полярных телец человека, пригодных для стандартного цитогенетического анализа. Предложенные модификации уже позволили провести хромосомный анализ первых полярных телец с эффективностью 94,1% (Verlinsky Y., Kuliev A.M., 2000).

Таким образом, **преконцепционная диагностика** наследственных болезней на материале полярных телец уже реально существует. Однако, насколько нам известно, в России она пока не применяется. Сложности работы с единичными клетками и большая вероятность диагностических ошибок не оправдывают значительных финансовых затрат на проведение прекоцепционной диагностики.

Диагностика на изолированных бластомерах позволяет получить более точную информацию о генотипе эмбриона. Обычно биопсия 1–2 бластомеров осуществляется на стадии 8–10 клеток. Поскольку на ранних стадиях дробления все бластомеры тотипотентны (т.е. взаимозаменяемы), удаление нескольких клеток не сказывается на дальнейшем развитии эмбриона. Методически анализ единичных бластомеров от дробящихся зародышей принципиально не отличается от анализа полярных телец.

Выбор метода молекулярной диагностики определяется спецификой исследуемой мутации и включает как метод ПЦР, так и более сложные ДНК-методы. Они позволяют проводить диагностику наиболее распространенных моногенных болезней – аутосомно-рецессивных (муковисцидоз, β -талассемия, спинальная амиотрофия Вердника–Гоффмана, болезнь Тея–Сакса), аутосомно-доминантных (миотоническая дистрофия, синдром Марфана, хорей Гентингтона), X-сцепленных (миодистрофия Дюшенна и синдром ломкой X-хромосомы), а также некоторых более редких болезней.

Цитогенетическая доимплантационная диагностика проводится на 1–2 бластомерах методом FISH с использованием ДНК-зондов, специфичных к прицентромерным или теломерным районам хромосом 16, 18, 21, 13, X, Y. При гетерозиготном носительстве транслокации одним из родителей для диагностики методом FISH используются цельнохромосомные ДНК-зонды (Verlinsky Y., Kuliev A.M., 2000).

Проблема диагностики численных аномалий кариотипа осложняется высокой частотой хромосомного мозаицизма на ранних стадиях эмбриогенеза человека. Доимплантационная диагностика на этой стадии может быть рекомендована только в случаях высокого риска (25–50%) рождения ребенка с наследственной патологией.

Более надежная доимплантационная диагностика может быть проведена на стадии бластоцисты. На этой стадии зародыш состоит примерно из 60–100 клеток. При визуализации трофобласта и эмбриобласта без ущерба для развития эмбриона можно удалить до 10 клеток трофобласта. Следует, однако, учитывать, что культивирование эмбрионов *in vitro* в программах ЭКО редко доводят до стадии бластоцисты, так как способность к имплантации таких эмбрионов может оказаться существенно сниженной.

Таким образом, *основное (и единственное) преимущество ДД перед обычным алгоритмом ПД на постимплантационных стадиях заключается в возможности начать беременность генетически полноценным эмбрионом. Ее недостатками являются: методические трудности, связанные с необходимостью работы с микроколичествами материала, ограничения диагностики рамками программ ЭКО и большая вероятность методических артефактов.*

ДД в России все еще находится в зачаточном состоянии. Она проводится только в нескольких ведущих центрах ЭКО, весьма дорогостояща, требует высокой квалификации специалистов, прецизионного оборудования и реактивов, чревата повышенной частотой ошибок. Нередко после ДД и наступления беременности с целью уточнения диагноза проводят стандартную ПД на постимплантационных стадиях. В силу вышеназванных причин *ДД никогда не станет массовой и ее значение в профилактике ВНЗ всегда будет минимальным.*

14.2. МЕТОД КОМБИНИРОВАННОЙ ПД ХРОМОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ В I ТРИМЕСТРЕ

В последние годы появляется все больше сообщений об эффективной цитогенетической ПД после комбинированного биохимического и ультразвукового методов в I триместре беременности (с 10-й по 12-ю неделю беременности). Биохимическая диагностика основана на анализе двух маркерных белков в сыворотке крови беременной: свободной β -субъединицы хориального гонадотропина и белка А, ассоциированного с беременностью (РАРР-А) (Юдина Е.В., Медведев М.В., 2002). Тестирование этих белков позволяет с высокой вероятностью (до 85%) выявлять женщин высокого риска по рождению детей с хромосомной патологией (болезнь Дауна). Другой важной составляющей комбинированной ПД является детекция двух сравнительно новых УЗ-маркеров хромосомных болезней: толщины воротникового пространства и визуализации носовой косточки. Анализ обширного клинического материала свидетельствует о том, что увеличение толщины воротникового пространства (ТВП) у плода более 2,5 мм, выявляемое при ультразвуковом скрининге на 11–14-й неделе беременности является серьезным маркером хромосомных болезней (выявляемость более 30%) и аномалий сердца (почти 90%) (Снайдерс Р.Дж., Николаидес К.Х., 1997; Некрасова Е.С. и др., 2004).

Первая публикация об отсутствии носовой косточки (НК) как УЗ-маркере болезни Дауна появилась в 2001 г. и сразу привлекла к себе пристальное внимание специалистов. При проспективном исследовании установлено отсутствие НК у 73% плодов с болезнью Дауна (43 из 59). Дальнейшие исследования показали, что сочетание биохимического (своб. β -НСГ + РАРР-А) и ультразвукового скринингов (ТВП + НК) позволяет выявлять до 97,5% плодов с хромосомными аномалиями, особенно с болезнью Дауна, при сравнительно низком (до 1,5%) числе ложноположительных результатов. Рассмотренный вариант комбинированного биохимического и ультразвукового скринингов в I триместре беременности оказывается более эффективным, чем во II. Естественно, что ПД в I триместре значительно предпочтительней, чем во втором, и для самой женщины.

Дальнейшим шагом в совершенствовании ПД в I триместре явилась разработка методов биохимического и ультразву-

кового скринингов с использованием новых высокоэффективных компьютеризированных программ расчета, применение которых сокращает время выдачи ответов до 1–2 ч. Это позволило в ряде стран Западной Европы (Великобритания) организовать специальные клиники разовых посещений для оценки риска хромосомных болезней (болезни Дауна) у плода: OSCAR (One Stop Clinic for Assessment of Risk). С учетом их высокой пропускной способности и эффективности, несомненных преимуществ для беременных, организация подобных клиник в России явилась бы важным государственным шагом на пути профилактики хромосомных болезней.

14.3. МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХРОМОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Кариотипирование плода на любом сроке беременности представляет собой длительный, кропотливый труд врачей-цитогенетиков, который нередко является основным фактором, лимитирующим объем и эффективность работы многих отечественных центров ПД.

В последние годы разработана и уже широко применяется за рубежом молекулярная диагностика наиболее частых хромосомных aberrаций, таких как трисомия 21 (синдром Дауна), трисомия 13 (синдром Патау), трисомия 18 (синдром Эдвардса), моносомия X-хромосомы (синдром Шерешевского–Тернера), других нарушений числа гомосом. На долю дисбаланса этих хромосом приходится почти 99% нарушений кариотипа, совместимых с живорождением и приводящих к хромосомным болезням в постнатальном периоде. Метод называется количественная флуоресцентная ПЦР (Quantitative Fluorescent PCR – QF-PCR). Принцип метода заключается в одновременной амплификации полиморфных по длине небольших фрагментов ДНК, расположенных на каждой из вышеперечисленных хромосом. При этом благодаря использованию в реакции ПЦР различных флуорохромов каждый из продуктов амплификации легко дискриминируется после разделения на электрофорезе, а применение специального прибора для анализа результатов позволяет точно определить дозу амплифицированной ДНК каждого фрагмента отдельной хромосомы (рис. 14.1). Наличие тройной дозы (трех копий) какого-нибудь фрагмента доказывает трисомию соответствующей хромосомы, двойной дозы – нормальный дип-

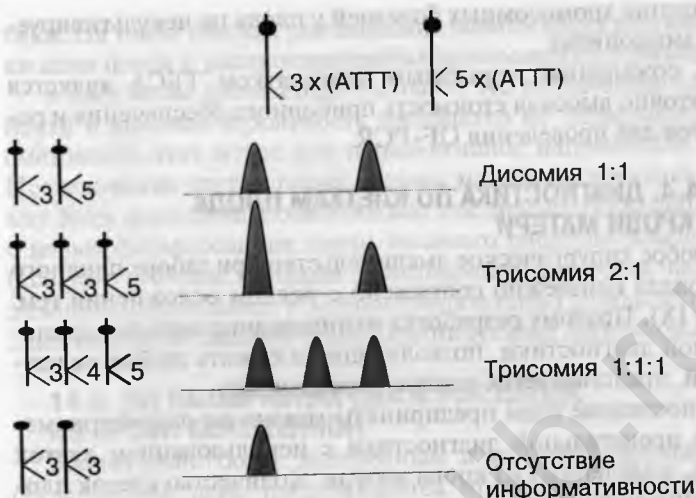


Рис. 14.1. Принцип метода количественной ПЦР (QF-PCR) для молекулярной диагностики частых хромосомных болезней.

лоидный набор, а одинарной — моносомию. Быстрота анализа (в среднем — 24–27 ч), высокая эффективность (выявляемость 97,8%), отсутствие ложноположительных или ложноотрицательных результатов, огромная пропускная способность (одновременное сканирование 300–3000 образцов) открывает большие диагностические перспективы перед этим методом, уже получившим второе название — тест быстрого скрининга анеуплоидии (ТБСА).

Важно подчеркнуть, что этот тест отнюдь не подменяет рутинное цитогенетическое кариотипирование, но позволяет оперативно выявить плоды с хромосомной патологией, в том числе и с хромосомным мозаицизмом, кариотип которых будет в дальнейшем детально проанализирован.

Таким образом, ТБСА следует рассматривать как *важное подспорье для кариотипирования, как новый эффективный скринирующий тест*, который может быть с успехом применен для анализа образцов амниотической жидкости или хориона/плаценты у женщин групп высокого риска, сформированных после биохимического и ультразвукового скринингов. В настоящее время метод QF-PCR уже широко используется в многочисленных центрах пренатальной диагностики для

выявления хромосомных болезней у плода на некультивируемых амниоцитах.

К сожалению, серьезным недостатком ТБСА является достаточно высокая стоимость приборного обеспечения и реагентов для проведения QF-PCR.

14.4. ДИАГНОСТИКА ПО КЛЕТКАМ ПЛОДА В КРОВИ МАТЕРИ

Любое хирургическое вмешательство при заборе плодного материала неизбежно сопряжено с риском осложнений (см. главу IX). Поэтому разработка неинвазивных методов пренатальной диагностики, позволяющих избежать любых осложнений, представляется вполне оправданной.

В последние годы предприняты усилия по разработке методов пренатальной диагностики с использованием клеток плода, выделенных из крови матери. Количество клеток плода, циркулирующих в крови беременной, оценивается как крайне незначительное – в среднем, 1×10^{-4} – 10^{-6} . Однако до сих пор остается дискуссионным вопрос о динамике их количества на разных сроках беременности, а также сохранности в организме матери после родоразрешения или прерывания беременности. Состав клеток плода в кровяном русле матери варьирует и представлен элементами собственно крови плода, в том числе ядерными эритроцитами, лимфоцитами и клеточными элементами плаценты (Masek M. et al., 2002).

Современная техника выделения клеток плода из крови матери включает методы проточной цитофотометрии, магнитной активации и градиентное центрифугирование. Эти подходы позволяют обогатить образец клетками плодного происхождения. Однако применение этих методов в широкой клинической практике затруднено по причине их высокой стоимости. Предприняты успешные попытки получения воспроизводимых в стандартных лабораторных условиях результатов с использованием ступенчатого центрифугирования в градиенте плотности фиколла либо путем отбора таких клеток на предметных стеклах при помощи иглы микроманипулятора после предварительной окраски на выявление фетального гемоглобина.

Лабораторные исследования клеток плода, выделенных из кровяного русла матери, проводятся с применением высокотехнологичных методов молекулярной генетики и цитогене-

тики. На таких клетках уже показана возможность диагностики пола плода и распространенных хромосомных болезней.

В настоящее время общепризнано, что технические сложности и высокая вероятность артефактов не позволяют рассматривать этот метод как перспективное направление ПД. Исследование клеток плода в крови матери на практике может быть использовано не столько для диагностики, сколько с целью формирования групп высокого риска по рождению больного ребенка. Большая себестоимость и высокая частота ложноположительных и ложноотрицательных результатов делают нерентабельными такие скринирующие программы.

14.5. ПД НА ОБРАЗЦАХ ДНК И РНК ПЛОДА ИЗ КРОВИ БЕРЕМЕННОЙ

Значительно более интересным и многообещающим на сегодняшний день представляется предложенный недавно подход, основанный на анализе ДНК и РНК плода, флотирующей в крови беременной женщины (Lo Y.M.D., 2002; Holzgreve W. et al., 2002). Предполагают, что ДНК из деградирующих клеток плода попадает в плазму материнской крови, где может быть обнаружена и проанализирована с помощью современных молекулярных методов. Из нескольких лабораторий мира поступили сообщения об успешной ПД по ДНК плода в крови матери резус-принадлежности и пола плода (Lo Y.M.D. et al., 1998; Holzgreve W. et al., 2005). Особенно удобным для этих целей оказался метод ПЦР в реальном времени. К сожалению, методические сложности, связанные с выделением и очисткой образцов ДНК плода из крови беременной, особенности ее молекулярного анализа сдерживают широкое применение этого метода. Неожиданным для исследователей оказалась достаточно высокая стабильность РНК плода, которая, как предполагается, может найти применение при диагностике генных болезней (Ding Ch. et al., 2004). Впервые, используя такой подход, удалось осуществить неинвазивную ПД β -талласемии. Предполагается, что анализ нуклеиновых кислот в крови беременной позволит проводить диагностику других аутосомно-доминантных болезней, наследуемых по отцовской линии (Holzgreve W. et al., 2005).

В заключение этого раздела следует еще раз подчеркнуть, что доимплантационная диагностика, равно как и диагностика по клеткам и ДНК плода в крови матери, пока не могут

составить сколь-нибудь реальную альтернативу ПД с использованием стандартных инвазивных методов в установленные сроки беременности. Именно благодаря высокой точности и минимальной опасности для матери и плода инвазивные методы ПД получили столь широкое применение во всем мире. Совершенствование этих стандартных способов в сочетании с повышением разрешающих возможностей молекулярных и цитогенетических методов исследования можно рассматривать как реальную перспективу развития ПД XXI в.

14.6. МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОГО КАРИОТИПИРОВАНИЯ

Разрешающая способность современных цитогенетических методов, основанных на дифференциальной окраске метафазных хромосом, составляет около 5 млн п.о. Применение методов гибридизации *in situ* с флуоресцеинмеченными ДНК-зондами известной локализации позволяет увеличить точность цитогенетического анализа до 5–500 тыс. п.о. В последнее время предложен метод молекулярного кариотипирования, разрешающая способность и универсальность которого практически не ограничены. Метод представляет собой один из вариантов метода сравнительной геномной гибридизации (CGH – Comparative Genome Hybridization). Принцип метода приведен на рисунке 14.2. Он сводится к тому, что ДНК пациента (плода), меченная одним флуорохромом, гибридизуется с ДНК субъекта с заведомо нормальным кариотипом, меченной другим флуорохромом. После этого продукт гибридизации наносится на панель образцов ДНК, выделенных из разных хромосом. Избыток (дупликации) или нехватки (делеции) целых хромосом или их фрагментов будут легко выявляться на соответствующих панелях (DNA-array) по разнице окраски гибридизационного сигнала (Vermeesch J.R. et al., 2005). Уже в первых экспериментах по отработке молекулярного кариотипирования были использованы панели ДНК-маркеров, перекрывающие весь кариотип человека с интервалом между ними в 1 млн. п.о. В настоящее время созданы ДНК-панели с плотностью ДНК-маркеров 10–100 тыс. п.о. (Ishkanian A.S., 2004).

Метод молекулярного кариотипирования представляет собой удачный симбиоз классической цитогенетики и ДНК-диагностики и, безусловно, найдет широкое применение при анализе не только числовых, но особенно мелких структур-

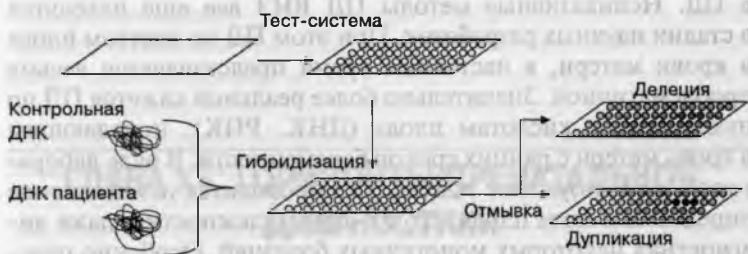


Рис. 14.2. Схема постановки реакции сравнительной геномной гибридизации. Тестируемый и контрольный образцы ДНК метятся разными флуорохромами (обычно красным и зеленым соответственно). Здесь – черного цвета ДНК пациента, серого цвета - контрольная ДНК. Обе пробы гибридизуются на планшете, в ячейках которого находятся ДНК фрагменты размерами около 1 млн. п.о. Если после отмывки копияность фрагментов ДНК у пациента и в контроле совпадает, цвет сигнала в ячейке представляет смесь двух красителей (обычно желтый, здесь – светло-серый). При наличии в образце ДНК пациента делеции цвет сигнала в соответствующей ячейке будет красным (здесь – серым), при наличии дупликации – зеленым (здесь – черным).

ных хромосомных aberrаций. Этот метод, однако, не позволяет идентифицировать сбалансированные хромосомные перестройки, такие как инверсии, транслокации или полиплоидии, которые могут быть с легкостью обнаружены при стандартном цитогенетическом анализе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные методы ПД включают доимплантационную диагностику (ДД), комбинированную биохимическую и УЗ-диагностику в I триместре беременности, молекулярную диагностику хромосомных болезней при помощи метода QF-PCR. Все эти подходы уже широко используются в передовых зарубежных центрах ПД Европы и США. Они по многим, главным образом, материальным причинам, только начинают применяться в единичных центрах ПД России. Применение ДД при всей ее привлекательности имеет ряд серьезных ограничений. ДД, по-видимому, навсегда останется высокотехнологичной, дорогостоящей процедурой сугубо индивидуального назначения. В отличие от ДД, комбинированный УЗ и биохимический скрининг в I триместре и молекулярная диагностика хромосомных болезней с помощью количественной флуоресцентной ПЦР уже нашли широкое применение

в ПД. Неинвазивные методы ПД ВНЗ все еще находятся в стадии научных разработок. При этом ПД по клеткам плода в крови матери, в настоящее время представляется весьма проблематичной. Значительно более реальной кажется ПД по нуклеиновым кислотам плода (ДНК, РНК), попадающим в кровь матери с ранних сроков беременности. В ряде лабораторий, используя этот подход, уже проводится неинвазивное определение пола плода, его Rh-принадлежности и даже диагностика некоторых моногенных болезней. Особенно перспективным в плане детального анализа кариотипа плода с целью выявления генетически несбалансированных хромосомных перестроек является метод молекулярного кариотипирования. Разработаны панели цитогенетических маркеров, перекрывающих весь геном человека с длиной «шага» (расстоянием между соседними маркерами) в 1 млн. п.о. и даже в 10–100 тысяч п.о. Автоматический анализ таких панелей облегчает и ускоряет процесс кариотипирования. Однако такой подход не позволяет идентифицировать сбалансированные перестройки кариотипа, а потому молекулярное кариотипирование, равно как метод QF-PCR, никогда не смогут полностью заменить стандартного цитогенетического анализа.

ГЛАВА XV. ГОРИЗОНТЫ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ

При рассмотрении перспектив развития ПД следует исходить не только из непосредственной практической значимости таких исследований, но и из тех возможностей, которые открывает ПД для фундаментальной науки в плане изучения генетических механизмов нормального и патологического эмбриогенеза человека, для профилактики и лечения ВНЗ. В качестве таких «горизонтов» ПД можно рассматривать:

- тестирование генов, контролирующих ранний эмбриогенез;
- генетическую карту репродуктивного здоровья (генетический паспорт беременной);
- генную и клеточную терапию плода.

15.1. ТЕСТИРОВАНИЕ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ РАННИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ

Следствием расшифровки генома человека, окончательный вариант которого был опубликован в 2003 г., т.е. ровно через 50 лет после появления знаменитой модели двойной спирали ДНК Уотсона–Крика, явилась идентификация многих тысяч новых генов, число которых в настоящее время оценивается величиной около 30 000. Среди уже идентифицированных генов несомненный интерес для ПД представляют гены-регуляторы (так называемые «факторы транскрипции»). Известно, что они становятся активными уже на ранних стадиях эмбриогенеза, и их функция заключается в последовательном включении (активации) многих других генов, определяющих синтез структурных белков, мембранных рецепторов, различных клеточных индукторов, детерминирующих процессы дифференцировки и раннего органогенеза. К настоящему времени уже достаточно хорошо изучены в эксперименте несколько семейств таких генов (SOX, PAX,

НОХ), контролирующих процессы нейруляции, формирование и дифференцировку различных отделов головного мозга, лицевого черепа, метамерию тела и др. (Корочкин Л.И., 2002). К их числу относится и ген SRY, направляющий развитие зародыша по мужскому типу. При анализе фенотипического проявления 923 генов в развитии человека, продукты 82 из которых относились к факторам транскрипции, было установлено, что мутации именно в этих генах особенно часто искажают программу индивидуального развития, вызывают аномалии и гибель плодов человека еще до рождения (Jimenez-Sanchez G. et al., 2001). Мутации большинства других генов (гены-рецепторы, гены ферментов и гены-модификаторы функции белков) проявляются уже в постнатальном периоде, обычно в течение первых лет жизни. В настоящее время известно более 30 вариантов множественных ВПР, при которых найдены мутации в генах-регуляторах. Не исключено, что мутации таких генов лежат и в основе 75% всех аномалий развития человека, этиология которых до сих пор остается невыясненной. Можно предполагать, что поиск и тестирование мутаций в генах факторов транскрипции может существенно улучшить диагностику ВПР на генном уровне и откроет новые возможности для их активной профилактики.

Важная информация о функции генома эмбриона человека на ранних стадиях развития может быть получена и в эксперименте. В частности, в опытах по изучению особенностей паттерна (спектра) метилирования метафазных хромосом на разных стадиях развития. Известно, что метилирование ДНК – один из ключевых механизмов в регуляции работы (инактивации) целых хромосом (например, инактивация одной X-хромосомы в женских клетках), хромосомных фрагментов (феномен «геномного импринтинга») и индивидуальных генов (Пендина А.А. и др., 2004; Залетаев Д.В. и др., 2004). С помощью моноклональных антител к метилцитозину (основному продукту метилирования ДНК) начаты широкомасштабные исследования особенностей метилирования метафазных хромосом человека на разных стадиях развития и в разных эмбриональных тканях (Пендина А.А. и др., 2005; Баранов В.С. и др., 2005). Уже первые эксперименты показали, что рисунок метилирования хромосом у зародышей человека существенно отличается от такового в хромосомах кле-

ток взрослого человека (культура лимфоцитов), он специфичен для разных тканей и для зародышей разных стадий развития. Есть основание предполагать, что анализ паттернов метилирования хромосом, их сопоставление с уже расшифрованной генетической картой каждой хромосомы позволяет получить новую информацию о функциональной активности хромосом и их сегментов в процессах эмбриогенеза в норме и при хромосомном дисбалансе. Не исключено, что в процессе таких исследований будут выяснены особенности надмолекулярной организации и регуляции функциональной активности хромосом в эмбриогенезе человека. Эти данные могут иметь принципиальное значение в понимании патогенеза ВНЗ.

15.2. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КАРТА РЕПРОДУКТИВНОГО ЗДОРОВЬЯ

Многолетний опыт убеждает в том, что важная роль в профилактике ВНЗ и различных патологических состояний, нередко сопутствующих и осложняющих нормальную беременность, принадлежит генетической карте репродуктивного здоровья (ГКРЗ) – семейной базе ДНК-данных (Баранов В.С., 2000). ГКРЗ отражает результаты медико-генетического, цитогенетического и молекулярного тестирования, проводимого до или на ранних сроках беременности с целью выяснения предрасположенности женщины к различным патологическим состояниям при беременности, выяснения скрытого носительства патологических генов и осуществления эффективной профилактики ВНЗ (Баранов В.С., 2004). Вариант ГКРЗ самой женщины и ее супруга, разработанный в лаборатории пренатальной диагностики ГУ НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН, приведен на рисунке 15.1.

Составление ГКРЗ начинается с медико-генетического консультирования, при котором кроме оценки риска ВНЗ у плода супруги получают рекомендации относительно пре-концепционной профилактики ВПР и наследственных болезней у плода. ГКРЗ включает анализ кариотипов обоих родителей с целью идентификации сбалансированных хромосомных перестроек, которые могут быть причиной хромосомных болезней у потомства, а также результаты генетического тестирования супругов на носительство наиболее частых мутаций, приводящих к таким распространенным болезням,

«ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КАРТА РЕПРОДУКТИВНОГО ЗДОРОВЬЯ»

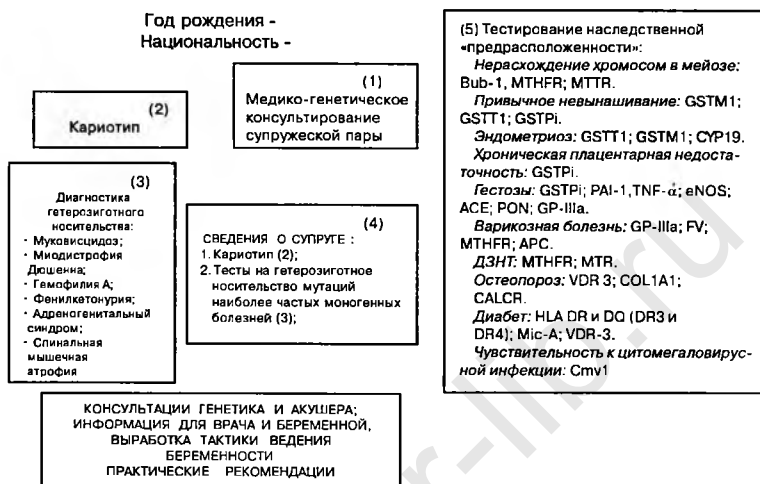


Рис. 15.1. Вариант «Генетической карты репродуктивного здоровья».

как муковисцидоз, аденогенитальный синдром, спинальная амиотрофия Верднига–Гоффмана, гемофилия А и В, фенилкетонурия, миодистрофия Дюшенна и др. Значительный раздел этого документа касается результатов тестирования полиморфных вариантов генов, ассоциированных с осложнениями, возникающими при беременности, такими как привычное невынашивание, диабет, гестозы. Следует определить полиморфизм генов, ассоциированных с ДЗНТ, с нерасхождением хромосом в мейозе, а также определяющих чувствительность женщины к цитомегаловирусу, ее предрасположенность к тромбофилии и варикозной болезни. Естественно, что такой генетический паспорт беременной, содержащий уникальную генетическую информацию о конкретном человеке, представляет собой исключительную ценность для объективного медико-генетического консультирования, для акушеров-гинекологов, наблюдающих за ходом беременности, для специалистов ПД. Широкое внедрение в медицинскую практику ГКРЗ, дополненной рекомендациями врачей-акушеров, медицинских генетиков, терапевтов, эндокринологов и др., может иметь решающее значение в профилактике раз-

личных осложнений беременности со стороны матери и плода, в выработке оптимального алгоритма ПД.

15.3. ГЕННАЯ И КЛЕТочНАЯ ТЕРАПИЯ ПЛОДА

ПД открывает уникальную возможность для получения материала плода практически на любой стадии развития (см. главу IX). Соответственно, на любом сроке беременности плод человека доступен и для различных воздействий, в том числе для использования различных вариантов клеточной и генной терапии, которая по мере совершенствования методической базы, биотехнологических приемов, а также выяснения контролирующих механизмов раннего эмбриогенеза человека становится все более реальной. Более того, несмотря на существующие ограничения в этой области в отношении человека, в этом направлении уже достигнуты вполне реальные успехи.

15.3.1. Клеточная терапия плода

Клеточная терапия плода (КТП) – сравнительно новое направление, возникшее в конце XX в. на стыке эмбриологии, цитологии, оперативного акушерства и вспомогательных репродуктивных технологий. До недавнего времени она была ограничена только одной операцией – внириутробным заменным переливанием крови во II–III триместрах беременности – которая проводилась с целью лечения гемолитической болезни плода, возникшей вследствие его Rh-конфликта с матерью. Впервые в России эта операция была проведена в нашем институте еще в 1986 г. и с тех пор широко используется для лечения гемолитической болезни новорожденных (Михайлов А.В. и др., 1990). В качестве варианта КТП можно рассматривать и применяемое в программе ЭКО лечение женского бесплодия путем восстановления «качества» яйцеклетки инъекцией в овулировавшие, но неполноценные яйцеклетки пациентки микрообъемов ооплазмы с находящимися в них митохондриями из овулировавших ооцитов другой женщины (Brenner N.A. et al., 1998).

Высокая пролиферативная активность эмбриональных клеток, перемещение и перемешивание клеток и зародышевых листков в процессах формирования органов и тканей, небольшие размеры плода (до 50 г на 13-й неделе беременности), незрелость его иммунной системы, высокое содержа-

ние стволовых клеток в эмбриональных тканях предопределяют широкие возможности КТП. Особый интерес специалистов вызывают данные о том, что вплоть до 20-й недели беременности ввиду своей функциональной незрелости иммунная система плода не является барьером, препятствующим трансплантации генетически чужеродных клеток. Более того, после ранней внутриутробной трансплантации организм новорожденного приобретает иммунологическую толерантность к трансплантированным чужеродным клеткам. Поэтому после внутриутробной пересадки здоровых клеток донора трансплантация таких же клеток в случае лечебной необходимости может быть с успехом повторена в постнатальном периоде.

В последние годы предпринимаются попытки лечения с помощью КТП (пересадка плодных мезенхимных клеток) такого тяжелого инвалидизирующего заболевания, как несовершенный остеогенез. К настоящему времени предпринято более 50 трансплантаций здоровых или генетически модифицированных клеток плоду человека с целью КТП по поводу самых различных наследственных заболеваний. Большинство таких попыток оказались неудачными в связи с неправильным выбором срока беременности, неудачным подбором заболевания или донорских клеток. Однако успешные результаты получены при КТП в случае различных иммунодефицитов, особенно формы XSCID (Flake A.W., 2004). Последнее, по-видимому, определяется тем, что здоровые клетки иммунной системы в условиях такой трансплантации имеют несомненные преимущества в своей пролиферативной активности перед аналогичными больными клетками. Клетки печени плода до 12-й недели беременности являются идеальным источником всех стволовых клеток крови. На этом же сроке беременности отсутствуют зрелые Т-лимфоциты, способные вызывать опасную для плода-реципиента реакцию «трансплантат против хозяина». Для лечения иммунодефицитов проводят трансплантацию клеток печени плода плюс сингенные им (т.е. от того же реципиента) клетки тимуса. В зависимости от срока беременности пересадку клеток плоду проводят внутрибрюшинно (14–16-я недели беременности) или через пупочную вену (19–30-я недели беременности) (Tougaîne J.L., 2000). С целью повышения эффективности КТП в дальнейших испытаниях предполагается трансплантировать

гемопозитические стволовые клетки вместе со стволовыми стромальными (мезенхимными) клетками. Кроме того, рассматривается возможность применения дополнительных воздействий с целью повышения конкурентоспособности донорских клеток и угнетения аналогичных клеток реципиента. Отмечается также, что мезенхимные (стромальные) клетки могут дифференцироваться в кости, хрящи, сухожилия, костный мозг и в мышцы. Они представляют особый интерес и уже проходят клинические испытания для лечения несовершенного остеогенеза (Flake A.W., 2004).

На уровне экспериментов пока остается коррекция многих наследственных дефектов печени, кроветворения и системы свертывания крови путем введения через пуповинную вену взвеси здоровых клеток печени медицинского абортуса. Считается, что создание таких искусственных химер может предотвратить развитие основного заболевания (Casal M.L., Wolfe J.H., 2001).

Вместе с тем, многие технические, методические и социальные вопросы КТП все еще остаются нерешенными. Как в условиях трансплантации будет происходить становление иммунологического статуса плода? Каковы будут иммунологические взаимоотношения между клетками донора и реципиента в зависимости от срока беременности, когда проводилась трансплантация? Может ли и каким образом проявиться реакция HLA несовместимости донора и реципиента? Как долго остаются жизнеспособными и сохраняются ли в постнатальном периоде трансплантированные клетки? Все эти вопросы пока активно изучаются в экспериментах на лабораторных грызунах и крупных млекопитающих (козы, овцы). Некоторые из таких исследований близки к клиническим испытаниям.

Помимо КТП, исследование стволовых клеток плода представляет большой самостоятельный интерес и в плане терапии различных заболеваний человека в постнатальном периоде. Огромные горизонты перед наукой и практикой открывают исследования стволовых клеток из доимплантационных зародышей человека и из пуповинной крови (Illmensee K., 2002). Пуповинные клетки плода уже проходят клинические испытания для лечения лейкозов, инфарктов миокарда, некоторых моногенных заболеваний, например, анемии Фанкони (Verlinsky Y. et al., 2001). Во многих странах уже соз-

даны банки пуповинной крови для лечения острых лейкозов и других заболеваний у детей. Активно обсуждается и уже внедряется в практику идея создания индивидуальных (именных) банков стволовых клеток (ИБСК) пуповинной крови для каждого новорожденного. Такие ИБСК могут иметь огромное значение при лечении различных заболеваний в постнатальном периоде. В марте 2004 г. создан первый отечественный криобанк стволовых клеток пуповинной крови плода в России на базе Института охраны здоровья матери и ребенка РАМН (Москва). Аналогичный криобанк предполагается создать и в Санкт-Петербурге на базе ГУ НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН.

15.3.2. Генная терапия плода

Наряду с клеточной терапией все большее внимание исследователей привлекает и идея генной терапии плода (ГТП). Последняя представляет собой продукт стремительного развития молекулярной биологии, биотехнологии, медицинской генетики.

Следует обратить внимание на очевидную эволюцию взглядов специалистов и врачей на эту проблему. Так, еще в 1999 г. решением Комитета по биотехнологии Национального института здоровья (НИЗ) (США) на проведение даже экспериментальных исследований по ГТП были наложены существенные ограничения (Coutelle Ch. et al., 2003). Согласно этому решению для начала работ по ГТП необходимо доказать:

- эффективность внедрения (трансфекции) чужеродных генных конструкций (ГК) в клетки плода;
- терапевтический эффект ГТП на биологических моделях наследственных заболеваний;
- безопасность ГК для пре- и постнатального развития плода;
- отсутствие риска повреждающего действия вирусных векторов (носителей ГК) для плода;
- отсутствие канцерогенности и токсичности ГК;
- минимальный риск интеграции ГК в половые клетки зародыша.

Благодаря интенсивным научным исследованиям по ГТ вообще и по ГТП, в частности, за последние пять лет отношение к возможности ГТП претерпело существенные измене-

ния. В феврале 2005 г. тот же Комитет, кстати, являющийся центральным распорядительным органом всех федеральных и многих международных клинических проектов по ГТ, пересмотрел и уточнил эти положения и, по сути, одобрил программу по ГТП человека, предложенную известными авторитетами в области ГТ и биоэтики американскими учеными Фрэнчем Андерсоном и Джоном Флечером (Waddington S.N. et al., 2005). Согласно этой программе:

- исследования по ГТП принципиально возможны, но должны быть потенциально полезны и иметь минимальный риск для плода;
- на современном этапе такие исследования должны проводиться преимущественно на экспериментальных животных (мыши, крысы, кролики, овцы, обезьяны);
- исследования по ГТП не должны быть направлены на коррекцию внешности или интеллекта;
- особое внимание надо обращать на опасность включения чужеродных генов в половые клетки плода;
- наиболее вероятными для первых клинических испытаний ГТП человека являются болезни иммунной системы, нарушения сывороточных белков крови (гемофилии, гемоглобинопатии).

Возросший в последнее время интерес к ГТП объясняется, прежде всего, существенным методическим прогрессом биотехнологии в создании новых эффективных векторов ГК, отработкой новых способов их адресной внутриклеточной доставки, доказательствами безопасности и эффективности ГТ в постнатальном периоде (Rolland A., 2005). Более того, вполне очевидно, что ГТП во многих отношениях имеет явные преимущества перед ГТ в постнатальном периоде. В частности, она позволяет начать лечение очень рано, еще в досимптоматическую фазу заболевания, когда последствия неблагоприятного эффекта мутантного гена еще не проявляются. Так же, как в случае КТП, введение генов в первую половину беременности позволяет избежать иммунного ответа организма реципиента на саму ГК и его белковый продукт. Небольшие размеры плода позволяют достичь более высокой концентрации трансгена (ГК) в тканях-мишенях и с большой вероятностью доставить ГК в стволовые клетки. Высокая пролиферативная активность эмбриональных клеток обеспечивает более благоприятные условия для внутриядерной доставки

введенных генов и их интеграции в геном зародыша. Успешная интеграция чужеродного гена в стволовые клетки позволяет надеяться на стабильное излечение наследственного заболевания.

С целью обеспечения адресной доставки и, главное, правильной работы чужеродного гена, конструируются специальные ГК, обеспечивающие его тканеспецифичную экспрессию. Так, экспрессия чужеродного гена в клетках кожи достигается с помощью промоторной части (фрагмента) гена кератина, в клетках печени — промотора гена антитрипсина, в мышцах — промотора гена креатинкиназы (Waddington S.N. et al., 2005).

Доставку ГК осуществляют при помощи различных векторов как вирусной (ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, лентивирусы и др.), так и невирусной (липосомы, поликатионы, пептиды, микросферы и др.) природы, которые вводят в эмбриональные ткани. Наиболее подробно в эксперименте изучена адресная доставка ГК путем их непосредственной инъекции в плод (внутриамниотически, внутрибрюшинно, через вену пуповины, непосредственно в мышцы, кожу, трахею плода) (Larson J.E. et al., 2000; Waddington S.N. et al., 2005). Испытываются и более сложные способы доставки типа генного «ружья» (Yoshizawa J. et al., 2004) или с помощью ультразвука (Endoh M. et al., 2002).

В настоящее время в различных лабораториях мира проводятся многочисленные экспериментальные исследования на биологических моделях с целью внутриутробного лечения таких частых наследственных болезней, как гемофилии, муковисцидоз, мышечная дистрофия Дюшенна, спинальная мышечная атрофия, фенилкетонурия, болезни накопления (мукополисахаридозы, гликогенозы, фосфолипидозы), гемоглобинопатии, различные иммунодефициты (Coutelle Ch. et al., 2003; Waddington S.N. et al., 2005). Естественно, что непременным условием проведения клинических испытаний по ГТП должна быть обязательная точная молекулярно-генетическая диагностика наследственной патологии у плода.

Вместе с тем, многие проблемы ГТП все еще остаются без ответа, и их решение имеет принципиальное значение для скорейшего внедрения этого многообещающего подхода в клиническую практику. Особенно большие опасения вызывают ГК, выполненные на основе модифицированных виру-

сов, в том числе и ретровирусов, способных интегрировать в геном зародыша. В частности, требует тщательной проверки возможная токсичность для плода генных векторов, их возможная тератогенность и даже онкогенность. Потенциальным источником опасности может быть резко ослабленный иммунный ответ в постнатальном периоде на вирусные векторы, примененные с целью антенатальной генной терапии. Что касается опасности интеграции чужеродных генов в геном половых клеток, то, по всей вероятности, она сильно преувеличена (Waddington S.N. et al., 2005). Первичные половые клетки достигают зачатков гонад уже на 7-й неделе беременности, т.е. много раньше, чем технически возможна ГТП на современном этапе. Находящиеся в зачатках гонад половые клетки практически недоступны для ГК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск мутаций в регуляторных генах (факторов транскрипции), контролирующих процессы эмбриогенеза, выяснение особенностей функциональной активности генома зародыша путем исследования паттернов метилирования метафазных хромосом зародыша человека на разных стадиях развития и в разных тканях позволяет приблизиться к пониманию фундаментальных проблем эмбрионального развития человека и может определить новые эффективные подходы в пренатальной диагностике наследственных и врожденных болезней.

Генетическая карта репродуктивного здоровья (ГКРЗ) является уникальным индивидуальным банком ДНК-данных. Она представляет собой исключительную ценность для объективного медико-генетического консультирования, для акушеров-гинекологов, наблюдающих за ходом беременности, для специалистов ПД. Ее широкое внедрение в медицинскую практику, дополненное рекомендациями врачей, может иметь решающее значение в профилактике различных осложнений беременности со стороны матери и плода, в выработке оптимального алгоритма ПД.

Генная терапия плода (ГТП) – продукт стремительного развития молекулярной биологии, биотехнологии, медицинской генетики, эмбриологии. Рассмотрены ограничения к применению ГТП, сформулированные Комитетом по биотехнологии НИЗ (США) в 1999 г., а также дополнения и изме-

нения этого решения тем же комитетом в 2005 г., который, по сути, уже одобрил программу исследований по ГТП с учетом ряда поправок и ограничений. Отмечены несомненные методические и клинические преимущества ГТП, которая позволяет начать превентивное лечение в досимптоматическую фазу заболевания, избежать иммунного ответа при введении чужеродных генетических конструкций (ГК), достичь более высокой концентрации трансгена и его продукта в клетках и с большей вероятностью провести коррекцию генетического дефекта в стволовых клетках зародыша. Рассмотрены генетические болезни – кандидаты для ГТП, генная терапия которых уже находится на стадии клинических испытаний. Наиболее реальными кандидатами для ГТП сегодня являются иммунодефициты, гемоглобинопатии и болезни свертывания крови (гемофилии). Целью подобных экспериментов является не только досимптоматическая профилактика (лечение) того или иного врожденного или наследственного заболевания, но предупреждение возможных неблагоприятных последствий ГТ для плода. В этой связи изучается токсичность генных векторов, вероятность трансфекции первичных половых клеток, возникновения аномалий развития, опасность онкологического эффекта, угроза отсутствия или резко ослабленный иммунный ответ на вирусы, использовавшиеся в качестве векторов ГК. Экспериментально доказано, что введенные в плод генные конструкции не включаются в половые клетки, которые к 7-й неделе беременности у человека уже достигают зачатков гонад плода.

Обосновывается представление о том, что для каждого наследственного и врожденного заболевания, диагностика которого возможна еще внутриутробно, следует разрабатывать свои уникальные варианты ГТ и КТ, ориентированные на определенные стадии эмбрионального развития, способы доставки ГК, тип векторов, с учетом индивидуальных особенностей генома плода и типа мутаций гена-кандидата.

Совершенствование генетической карты репродуктивного здоровья, исследование мутаций в регуляторных генах, клеточная и генная терапия плода представляют собой передний край ПД как науки. Разработка всех этих перспективных научно-практических направлений активно ведется в лаборатории пренатальной диагностики ГУ НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пренатальная диагностика (ПД) представляет собой обширную область знаний, в которой интегрированы методы и концепции как фундаментальных наук, так и практической медицины. Главная цель ПД и ее основные задачи сосредоточены на ранней диагностике и профилактике врожденных и наследственных заболеваний (ВНЗ). Основное место в этом принадлежит медицинской генетике. Именно с помощью методов и подходов медицинской генетики удается дискриминировать врожденные и наследственные пороки развития, что необходимо для выработки оптимальной тактики ведения беременности, профилактики и лечения пороков развития у плода.

При всем своем многообразии и мультидисциплинарности ПД следует рассматривать как раздел медицинской генетики. Вместе с тем, гиперболизация любого составляющего ПД (ультразвуковые исследования, акушерство с инвазивными методами получения тканей плода, перинатальная медицина с новыми технологиями оперативных вмешательств и другое) неминуемо ведет к концептуальным и методическим перекосякам в области профилактики ВНЗ, пагубно сказывается на всей службе ПД в целом. Только комплексное обследование супругов, женщины во время беременности и ее будущего ребенка позволяет добиться максимальной эффективности ПД как в профилактике ВНЗ, так в недалеком будущем – и в их лечении. Обязательными составляющими службы ПД являются медико-генетическое консультирование (глава V), биохимический, ультразвуковой и цитогенетический скрининги (главы VI, VII, VIII), инвазивные процедуры с целью забора плодного материала (глава IX), специальные цитогенетические (глава X) и молекулярные (глава XI) исследования биоптатов плода.

Естественно, что наиболее удобной для беременной женщины и ее семьи является такая организация ПД, когда все звенья этой службы сосредоточены в одном месте, а в идеале — в одном центре. Не случайно на сегодняшний день наиболее прогрессивным вариантом такой «унитарной» модели считается «Клиника одного дня» (OSCAR — One Stop Clinic for Assessment of Risk), где в течение 5–6 ч беременная женщина (предпочтительно в I триместре) может пройти полное пренатальное обследование. В частности, получить консультацию генетика, пройти комбинированный скрининг (биохимический + ультразвуковой) и при необходимости подвергнуться инвазивной ПД. Несколько таких клиник уже успешно работают в Великобритании. В этом направлении развивается и служба ПД в ФМГЦ НИИАГ им. Д.О.Отта РАМН. Важно отметить, что применяемый нами ускоренный вариант прямого метода приготовления хромосомных препаратов позволяет дополнить вышеперечисленные услуги такой клиники и кариотипированием плода. Благодаря этому снимается психоэмоциональное напряжение у женщины, связанное с длительным ожиданием результатов диагностики, и экономится время для принятия супругами решения о судьбе беременности.

Конечно, такая *унитарная (монокомпонентная) модель* требует не только достаточного помещения, но и четкого взаимодействия всех функциональных подразделений, обеспечивающих весь алгоритм ПД. Доминирующей в нашей стране является *мультицентровая (многокомпонентная) модель службы ПД*. Согласно этой модели, все службы ПД разобщены не только территориально, но и административно, т.е. концептуально они различаются по своим основным целям и задачам, объем их работы и интересы сотрудников отнюдь не ограничиваются проблемами ПД. Обычно на базе медико-генетических центров проводится УЗ-диагностика и биохимический скрининг, акушерские клиники специализируются на УЗ-исследованиях, операциях по забору плодного материала, родоразрешению и прерыванию беременности. Цитогенетические и молекулярные исследования проводятся в разных специализированных лабораториях, институтах и ФМГЦ, нередко расположенных в разных учреждениях. Естественно, что при такой организации, даже при наличии высококвалифицированных специалистов в каждом из пере-

численных подразделений, неизбежны потери времени на дополнительные консультации. Длительное путешествие плодного материала ухудшает качество диагностических препаратов, увеличивает опасность потери образцов. К дальнейшей децентрализации ПД ведет хроническое недофинансирование этой службы в России, превращение ее составляющих в платные услуги. При этом нередко ПД начинает подменяться УЗИ или превращается в придаток акушерско-гинекологической службы. *Такое «перетягивание одеяла», наблюдаемое во многих городах и регионах России, пагубно сказывается на состоянии всей службы ПД, а с учетом выраженного спада рождаемости в стране — существенно усугубляет и без того сложную демографическую ситуацию.*

Наш почти 20-летний опыт работы убеждает в том, что независимо от особенностей организации службы ПД в каждом центре и регионе, обязательным условием ее эффективности является четко скоординированная работа всех ее звеньев. Таким связующим звеном, по нашему опыту, является регулярное обсуждение на врачебных конференциях каждого клинического случая, требующего проведения инвазивной ПД. Помимо врачей акушеров-операторов в таких обсуждениях всегда участвуют врач УЗ-диагностики, медицинский генетик, специалисты, ответственные за лабораторные методы исследования (цитогенетик, молекулярный биолог, биохимик). Клиническая оценка каждого случая, требующего инвазивного вмешательства, позволяет избежать субъективных ошибок, допущенных на первичных приемах, еще раз взвесить показания и возможные противопоказания, соотнести сроки операции и предполагаемый тип биоптата (ворсинки хориона, пуповинная кровь, амниотическая жидкость) с планируемыми специальными методами лабораторного исследования и наметить дальнейшую тактику ведения беременности после ПД. Несмотря на кажущуюся простоту исполнения и безопасность забора плодного материала, это оперативное вмешательство. Даже минимальный риск такой операции должен быть оправдан. По крайней мере, он не должен превышать риск наличия ВНЗ у плода.

Необходимость консолидации усилий разных специалистов, занятых в ПД, требует не только четкой организации этой службы, но и достаточной осведомленности всех ее участников в проблемах, методах и возможностях ПД. Такая

информация помогает избежать межведомственной и узко-профессиональной разобщенности, что предохраняет от многих ошибок и способствует повышению профессионального уровня специалистов всех звеньев, работающих в области ПД. Возможно, пока еще рано поднимать вопрос об учреждении новой специальности — «врач пренатальной диагностики», но вектор исторического и концептуального развития этого научно-практического раздела медицинской генетики указывает на целесообразность движения в этом направлении.

Уместно еще раз обратить внимание на правильную, взвешенную интерпретацию результатов биохимического и ультразвукового скринингов. В частности, обладая большой чувствительностью и сравнительно малой специфичностью, результаты биохимического скрининга только указывают на наличие (отсутствие) отклонений в содержании маркерных эмбриональных белков в крови матери. Причины же таких отклонений могут быть различными (см. главу VII). Напомним, что во II триместре беременности при отклонении МСБ только в 2% случаях подтверждаются хромосомные нарушения у плода. Существенные колебания этих показателей могут сигнализировать и о наличии другой, ненаследственной патологии, связанной с угрозой прерывания беременности или иными нарушениями со стороны матери или плода.

Примат результатов специальных лабораторных исследований в полной мере относится и к результатам УЗ-диагностики. Увлечения последних лет поиском УЗ-маркеров, специфичных для определенных хромосомных болезней, появление попыток диагностики хромосомных и даже генных заболеваний на основании только УЗ-исследований кажется весьма опасной тенденцией современной ПД. Признавая огромную значимость УЗИ в ПД, важно отметить, что диагноз наследственной болезни хромосомной или генной этиологии может быть установлен только на основании специальных лабораторных методов исследования, но никак не при помощи только УЗИ. Большая помощь в этом со стороны УЗИ заключается только в отборе женщин группы высокого риска наследственной патологии.

Независимо от результатов биохимического и даже УЗ-скринингов, окончательный диагноз хромосомных и, тем более, генных нарушений у плода может быть поставлен только с помощью специальных цитогенетических и молекулярных методов исследования.

Уместно также обратить внимание читателя на необходимость более продуманного, взвешенного отношения специалистов, занятых в области ПД, к внедрению в практику новых, очень интересных, но зачастую до конца не проверенных и, тем более, еще не лицензированных методов диагностики.

Так, увлечение диагностикой наследственных болезней по клеткам плода в крови матери, кажется, уже прошло. Суровый вердикт многих ведущих специалистов ПД был однозначен: метод слишком ненадежен, чтобы быть диагностическим, и слишком дорог, чтобы быть скринирующим. В настоящее время проходит всестороннюю апробацию метод ПД, основанный на исследовании ДНК плода, находящейся в крови матери (см. главу XV). Более ранние попытки отечественных ученых и специалистов, в том числе и нашей лаборатории, по определению пола плода по крови матери оказались неудачными (Кашеева Т.К. и др., 1991). Позитивные результаты анализа резус-принадлежности и пола плода при использовании данного метода недавно получены только в нескольких лабораториях ПД в Сингапуре и в Австрии. Естественно поэтому, что пока нет никаких правовых, юридических и моральных оснований для использования этого, безусловно, прогрессивного и многообещающего подхода в практической ПД. К сожалению, уже зарегистрированы единичные случаи оказания подобной услуги, к тому же на платной основе, в России и даже в Санкт-Петербурге. Из этого следует, что методы, используемые в ПД, должны лицензироваться особенно тщательно. Не общей разрешающей строкой, как, например, «лицензирование ДНК-диагностики инфекций», но вполне конкретно по каждому методу и приему диагностики отдельно.

Следует обратить внимание и на определенное увлечение некоторых центров в Москве и в Санкт-Петербурге, а также в других регионах России доимплантационной диагностикой. Как уже отмечалось (см. главу XV), при всем восхищении филигранностью, точностью и некоторыми безусловными преимуществами этого метода, он не лишен и существенных недостатков. Главный из них заключается в том, что этот метод никогда не станет массовым, то есть с его помощью никогда нельзя будет решать социальные и медицинские вопросы ПД в масштабах города и всей страны. Неопределенно долго, скорее всего, всегда, метод доимплантационной диагностики

останется уделом отдельных семей высокого материального достатка. Он всегда будет оставаться «штучным товаром».

В завершение этого коллективного труда специалистов одного из ведущих центров ПД хотелось бы еще раз подчеркнуть, что, по нашему мнению, все методические проблемы ПД в России уже решены. Главными проблемами, сдерживающими развитие ПД в нашей стране на сегодняшний день, являются: отсутствие целевого финансирования и явно недостаточное внимание к нуждам ПД как со стороны федерального правительства, так и местных властей (1); ошибки и недостатки планирования и организации службы ПД на местах (2); «междисциплинарные распри» («перетягивание» ПД в акушерство, подмена ПД УЗ-диагностикой) (3); нарастающая коммерциализация услуг ПД (4). Нетрудно видеть, что все перечисленные проблемы в значительной мере проистекают из-за дефицита финансирования этой высокорентабельной, высокоэффективной и социально важной области медицинской генетики. Настала пора критически пересмотреть ныне действующие Приказы Минздрава РФ (№316 от 30.12.1993 и №457 от 28.12.2000), разработать на их основе новый приказ по медицинской генетике и пренатальной диагностике, который бы больше соответствовал духу времени, финансовым возможностям государства, безусловному росту методических и кадровых возможностей всей службы ПД в России.

Надеемся, что этот труд, выстраданный годами плавания авторов в море проб и ошибок, находок и озарений, будет полезным руководством для врачей и специалистов так или иначе связавших свою судьбу с пренатальной диагностикой, для организаторов здравоохранения, отвечающих за состояние службы ПД, для студентов медицинских и биологических факультетов. Будем особенно рады, если эта книга найдет отклик и в душе рядового читателя, интересующегося достижениями современной науки в области генетики человека, ранней (дородовой) диагностики и профилактики врожденных и наследственных болезней.

ЛИТЕРАТУРА

Айламазян Э.К. Акушерство: Учебн. для мед. вузов. — СПб: Специальная литература, 1998. — 494 с.

Айламазян Э.К., Баранов В.С. Молекулярная медицина — новое направление в акушерстве и гинекологии // Акуш. и гинекол. — 2002. — №4. — С. 9—14.

Акопян Г.Ф. Состояние районов С-гетерохроматина хромосом 1, 9, 16 и Y в онтогенезе человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1988. — 18 с.

Баранов В.С. Генетические основы предрасположенности к некоторым частым мультифакториальным заболеваниям // Мед. генетика. — 2004. — №3. — С. 102—112.

Баранов В.С., Кузнецова Т.В., Вахарловский В.Г. и др. Пренатальная диагностика в акушерстве: современное состояние, методы, перспективы. Метод. Пособие. — СПб.: «Издательство Н-Л», 2002. — 64 с.

Баранов В.С. Метод стряхивания-отпечатывания — простой и надежный способ приготовления прямых хромосомных препаратов из хориона // Цитология. — 1989. — Т. 31. — №2. — С. 251—253.

Баранов В.С. Научные и практические аспекты пренатальной диагностики // Вестн. РАМН. — 2003. — №10. — С. 8—13.

Баранов В.С. Программа «Геном человека» как научная основа профилактической медицины // Вестн. РАМН. — 2000. — №10. — С. 27—37.

Баранов В.С., Пендина А.А., Кузнецова Т.В. и др. Некоторые особенности статуса метилирования метафазных хромосом у зародышей человека доимплантационных стадий развития // Цитология. — 2005. — Т. 47. — №8. — С. 723—730.

Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены «предрасположенности»: Введение в предиктивную медицину. — СПб: Интермедика, 2000. — 271 с.

Баранов В.С., Горбунова В.Н., Вахарловский В.Г. и др. Наследственные болезни / В кн.: «Медицинская лабораторная диагностика (программы и алгоритмы)». Под ред. А.И.Карпищенко. — СПб: Интермедика, 1997. — Т. 3. — С. 180—202, 203—227.

Баранов В.С., Кузнецова Т.В., Швед Н.Ю., Баранов А.Н. Пренатальная диагностика хромосомных болезней плода: Методические рекомендации. — СПб. 1995. — 21 с.

Баранов В.С., Лебедев В.М., Полеев А.В. и др. Ускоренный прямой метод получения метафазных и прометафазных хромосом из клеток биоптата хориона и эмбрионов человека в первом триместре беременности // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 1990а. — Т. 110. — №8. — С. 196—198.

Баранов В.С., Попова М.В., Новикова Л.Н. и др. Цитогенетическое исследование хориона человека с целью пренатальной диагностики наследственных болезней // Цитология. — 1990б. — Т. 32. — №1. — С. 74—78.

Баранов В.С., Романенко О.П., Симаходский А.А. и др. Частота, диагностика, профилактика наследственных болезней и врожденных пороков развития в Санкт-Петербурге. — СПб: Медицинская пресса, 2004. — 126 с.

Бахарев В.А. Пренатальная диагностика. / В кн: «Диагностика и лечение врожденных и наследственных заболеваний у детей». Путеводитель по клинической генетике. — М.: Триада-Х, 2004. — С. 351–406.

Бодемар Ч. Современная эмбриология. — М.: Мир, 1971. — 446 с.

Бочков Н.П. Перспективы медицинской генетики. — М.: Медицина. — 1982. — 400 с.

Бочков Н.П. Клиническая генетика. — М.: Медицина, 1997. — 287 с.

Бочков Н.П. Клиническая генетика. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. — 448 с.

Бочков Н.П. Клиническая генетика. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. — 475 с.

Бочков Н.П. Этические проблемы современной генетики / В кн.: «Биомедицинская этика». Под ред. В.И.Покровского, Ю.М.Лопухина. Вып. 3. — М.: Медицина, 2002. — С. 64–70.

Бочков Н.П., Захаров А.Ф., Иванов В.И. Медицинская генетика: руководство для врачей. — М.: Медицина, 1984. — 366 с.

Бочков Н.П. Генетические технологии в педиатрии // Педиатрия. — 1995. — №4. — С. 21–26.

Вахарловский В.Г. Особенности медико-генетического консультирования беременных, направляемых на пренатальную диагностику. О фетологии // Актуальные вопросы физиологии и патологии репродуктивной функции женщины. — СПб., 1994. — С. 55–56.

Вахарловский В.Г., Баранов В.С. Наследственные болезни и дородовая диагностика. — СПб.: Знание, ИВЭСЭП, 2003. — 46 с.

Вахарловский В.Г., Горбунова В.Н., Кашеева Т.К. Исследование содержания АФП в сыворотке крови беременных как критерия наличия врожденных пороков развития у плода // Акуш. и гин. — 1995. — Т. 4. — С. 22–25.

Вахарловский В.Г., Кашеева Т.К., Баранов В.С. Риск болезни Дауна у плода в зависимости от возраста матери / В сб.: «Современные проблемы формирования здоровья человека в перинатальном периоде и детском возрасте». Под ред. Н.П.Шабалова. — СПб., 2004. — С. 52–54.

Вахарловский В.Г., Кошелева Н.Г., Гусева М.Е., Баранов В.С. О некоторых спорных вопросах медико-генетического консультирования, связанных с приемом лекарственных препаратов во время беременности (обзор литературы) // Пробл. репродукции. — 1999. — №3. — С. 17–21.

Вахарловский В.Г., Кузнецова О.В., Хоменко Э.В., Кошелева Н.Г. Лекарства, беременность и плод // Медико-генетическое консультирование в профилактике наследственных болезней. — М., 1997. — С. 100–101.

Вахарловский В.Г., Лагуева Ф.К., Кусова С.О. и др. Беременность и роды у больных гепатолентикулярной дегенерацией // Журн. акуш. и жен. болезней. — 2003. — Вып. 4. — С. 68–71.

Вахарловский В.Г., Мартышин М.Я., Алипов В.И. Особенности течения гепатолентикулярной дегенерации у женщин // Вопр. охраны материнства и детства. — 1982. — №3. — С. 62–66.

Вахарловский В.Г., Кошелева Н.Г., Айламазян Э.К., Баранов В.С. Фармакологические и другие проблемы медико-генетического консультирования беременных // Журн. акуш. и женских болезней. — 2004. — №3. — С. 28–33.

Вихрук Т.И., Лисовский В.А., Сологуб Е.Б. Основы тератологии и наследственной патологии. — М.: Советский спорт, 2001. — 204 с.

Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. Хромосомные синдромы и аномалии. Классификация и номенклатура. — Ростов-на-Дону: Изд-во РГМУ, 1999. — 192 с.

Вяткина С.В., Нагорная И.И., Логинова Ю.А. и др. Проблема хромосомного мозаицизма у пациенток с синдромом Шерешевского—Тернера // Мед. генетика. — 2003. — №3. — С. 18—25.

Гагарина А.В. Плацентарная недостаточность при повышенном содержании альфа-фетопротеина и хорионического гонадотропина в крови беременных женщин: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб, 2004. — 26 с.

Гагарина А.В., Кузнецова Т.В., Ожиганова И.Н. и др. Особенности течения и исхода беременности при хромосомном мозаицизме, ограниченном плацентой // Журн. акуш. жен. болезней. — 2002. — Т. 11. — №1. — С. 40—45.

Гагарина А.В., Павлова Н.Г., Кашеева Т.К. Гемодинамические параметры в функциональной системе мать—плацента—плод у женщин, имевших повышенные уровни альфа-фетопротеина и хорионического гонадотропина во втором триместре беременности // Журн. акуш. и женск. болезней. — 2002. — Вып. 4. — С. 22—26.

Гинтер Е.К. Медицинская генетика. — М.: Медицина, 2003. — 447 с.

Глотов А.С., Киселев А.В., Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Анализ делеционных повреждений в генах SMN1, SMN2, NAIP у пациентов со спинальной мышечной атрофией Северо-Западного региона России // Генетика. — 2001. — Т. 37. — №8. — С. 1156—1159.

Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. — СПб: Специальная литература, 1997. — 286 с.

Горбунова В.Н., Вахарловский В.Г., Кашеева Т.К. и др. О скринировании беременных на содержание альфа-фетопротеина в крови // Мат. XX научной сессии НИИАГ им. Д.О.Отта. — Л., 1991. — С. 42—45.

Государственный доклад о состоянии здоровья населения РФ в 2000 году // Здоровоохранение РФ. — 2000. — №3. — С. 10.

Громько Г.Л., Шпаков А.О. Современные представления о механизме регуляции кровообращения в плаценте при физиологической и осложненной беременности // Вест. Росс. асс. акуш. гинек. — 1995. — №4. — С. 35—41.

Гузев Г.Г. Актуальные проблемы медико-генетического консультирования / В кн.: «Основы пренатальной диагностики». Под ред. Е.В.Юдиной, М.В.Медведева // Реальное время. — 2002. — 256 с.

Давиденкова Е.Ф., Бутомо И.В., Ковалева Н.В., Верлинская Д.К. Увеличение частоты и риска рождения детей с болезнью Дауна в Ленинграде // Генетика. — 1994. — Т. 30. — №2. — С. 105—110.

Данилов Р.К., Боровая Т.Г. Общая и медицинская эмбриология. — СПб: Специальная литература, 2003. — 231 с.

Демографический ежегодник России: Стат. сб. / Госкомстат России. — М., 2002.

Димитров Д. Хориальный гонадотропин человека / Пер. с болг. — М.: Медицина, 1979. — 143 с.

Дубинина И.Г. Исследование альфа-фетопротеина для выявления групп с генетическим риском во время беременности // Итоги науки и техники. Генетика человека. — М., 1990. — Т. 7. — С. 119—169.

Дыбан А.П. Механизм тератогенного действия фармакологических веществ и охрана здоровья в антенатальном периоде жизни // Вестн. АМН СССР. — 1966. — №6. — С. 34—43.

Дыбан А.П. Очерки патологической эмбриологии человека. — Л.: Медгиз, 1959. — 327 с.

Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих. — Л.: Наука, 1988. — 228 с.

Дыбан А.П., Баранов В.С. Оогенез млекопитающих / В кн.: «Современные проблемы оогенеза». — М.: Наука, 1977. — 314 с.

Дыбан А.П., Баранов В.С. Цитогенетика эмбрионального развития млекопитающих. — М.: Наука, 1978. — 216 с.

Залетаев Д.В., Немцова М.В., Бабенко О.В. Система генетических и эпигенетических маркеров в ДНК-диагностике злокачественных новообразований / В кн.: «Введение в молекулярную медицину». Под ред. М.А.Пальцева. — М.: Медицина, 2004. — С. 35–93.

Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Хромосомы человека (Атлас) АМН СССР. — М.: Медицина, 1982. — 264 с.

Здравоохранение в России: Стат. сб. / Госкомстат России. — М., 2001.

Золотницкая Р.П. Методы гематологического исследования / В кн.: «Лабораторные методы исследования в клинике». Под ред. В.В.Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — С. 106–148.

Золотухина Т.В., Кухаренко В.И. Методы пренатальной цитогенетической диагностики // Итоги науки и техн. — 1990. — Т. 7. — С. 67–118.

Иванов В.И., Ижевская В.Л. Геномика и этика / В кн.: «Геномика — медицине». Под ред. В.И.Иванова, Л.Л.Киселева. — М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. — 392 с.

Иващенко Т.Э., Асеев М.В., Баранов В.С. Методы молекулярной диагностики генных болезней. Медицинские лабораторные технологии. Справочник. — 1999. — СПб: Интермедика. — Т. 2. — С. 603–617.

Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Биохимические и молекулярно-генетические аспекты патогенеза муковисцидоза. — СПб: Интермедика, 2002. — 252 с.

Ижевская В.Л. Этические аспекты пренатальной диагностики / В кн.: «Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике». Под ред. А.В.Масленникова. — Новосибирск: Альфа-Виста, 2003. — С. 46–58.

Ижевская В.Л., Иванов В.И. Геномика в медицине: этические проблемы и подходы к их решению / В кн.: «Введение в молекулярную медицину». Под ред. М.А.Пальцева. — М.: «Медицина», 2004. — С. 11–34.

Казаков В.И., Ключева С.К., Прозорова М.В. Основы медико-генетического консультирования. — СПб.: Издательский дом СПб МАПО, 2002. — 71 с.

Кази З. Пренатальная диагностика пола плода и некоторых моногенных заболеваний в первом триместре беременности с помощью биопсии хориона: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1979. — 19 с.

Карлов В.А., Власов П.Н. Современная терапевтическая тактика ведения беременных больных эпилепсией женщин // «Человек и лекарство». — М., 1996. — С. 131.

Карлсон Б. Основы эмбриологии по Пэттену. — М.: Мир, 1983. — Т. I. — 383 с.; Т. II. — 390 с.

Карпов О.И., Зайцев А.А. Риск применения лекарств при беременности и лактации. — СПб.: БХВ-Санкт-Петербург, 1998. — 341 с.

Кашеева Т.К., Вахарловский В.Г., Гусева М.Е. и др. Исследование АФП и ХГ в сыворотке крови беременных, корреляция с состоянием плода и течением беременности // Медико-генетическая служба Санкт-Петербурга (к 30-летию медико-генетического центра). — СПб., 1999. — С. 174–178.

Кашеева Т.К., Вахарловский В.Г., Гусева М.Е. и др. Опыт биохимического скрининга маркерных сывороточных белков у беременных Санкт-Петербурга (1997–2002) // Пrenатальная диагностика. – 2004. – Т. 3. – №2. – С. 94–98.

Кашеева Т.К., Горбунова В.Н., Баранов В.С. Амниотическая жидкость / В кн.: «Медицинская лабораторная диагностика (программы и алгоритмы)». Под ред. А.И.Карпищенко. Т. 2. – СПб: Интермедика, 1997а. – С. 250–260.

Кашеева Т.К., Кузнецова Т.В., Рамша Ю.К., Лебедев В.М., Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Применение реакции специфической амплификации в пренатальной диагностике пола плода и генотипировании индивидуальных клеток // Биополимеры и клетка. – 1991. – Т.7. – №3. – С. 45–49.

Кашеева Т.К., Некрасова Е.С. Первый опыт комбинированного биохимического и ультразвукового скрининга в I триместре беременности // Лаб. диагностика. – 2005. – Т. 3. – С. 24–25.

Кашеева Т.К., Полянцев Д.Г., Шаповалов В.В. и др. Опыт использования автоматизированной системы расчета риска патологии плода // Тетра medica. – 2002. – №1. – С. 25–27.

Кирющенко А.П. Влияние вредных факторов на плод. – М., 1978. – 262 с.

Кирющенко А.П. Основы фармакотерапии при беременности // Акушерство и гинекология. – 1988. – №1. – С. 68–75.

Китаев Э.М. Из истории развития программы ЭКО в России. – СПб., 2004. – 187 с.

Кнорре А.Г. Краткий очерк эмбриологии человека. – Л.: Медицина, 1967. – 268 с.

Кнорре А.Г. Эмбриональный гистогенез (морфологические очерки). – Л.: Медицина, 1971. – 429 с.

Кодекс врачебной этики / В кн.: «Биомедицинская этика». Под ред. В.И.Покровского, Ю.М.Лопухина. – Вып. 2. – М.: Медицина, 1999. – С. 27–48.

Козлова С.И., Демикова Н.С., Семанова Е., Блинникова О.Е. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование. – М.: Практика, 1996. – 416 с.

Коротеева О.С. Управление развитием медико-генетической помощи населению: Автореф. дис. ... канд. экон. наук. – СПб: Изд-во СПб ГУЭФ, 2003. – 18 с.

Корочкин Л.И. Биология индивидуального развития. – М.: Изд-во Московского ун-та, 2002. – 263 с.

Кوشелева Н.Г., Аржанова О.Н., Плужникова Т.А. и др. Невынашивание беременности: этиопатогенез, диагностика, клиника и лечение. – СПб: «Издательство Н-Л», 2002.

Кузнецов М.И., Золотухина Т.В., Матвеева Е.В. Опыт использования кордоцентеза в целях пренатальной диагностики // Педиатрия. – 1994. – №2. – С. 93–95.

Кузнецова Т.В. Комплексный подход к цитогенетике эмбрионального развития человека. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – СПб., 2000. – 38 с.

Кузнецова Т.В., Баранов А.Н., Киселева Н.В. и др. Пrenатальная диагностика хромосомных болезней у плода: десятилетний опыт // Вестн. Рос. ассоц. акушер. гинек. – 1997. – №3. – С. 94–99.

Кузнецова Т.В., Гагарина А.В., Баранов В.С. Ограниченный плацентарный мозаицизм: биологические и медицинские аспекты // Пrenат. диагн. – 2002. – Т. 1. – №2. – С. 141–153.

- Кузнецова Т.В., Логинова Ю.А., Чиряева О. Г. и др.* Цитогенетические методы // В кн.: «Медицинские лабораторные технологии». Справочник. — Т. 2. — СПб.: Интермедика, 1999. — С. 550–578.
- Кулешов Н.П.* Современные методы в клинической цитогенетике (Учебно-методическое пособие) // Современные проблемы в клинической цитогенетике. Сборник научных трудов. Под ред. Н.П.Кулешова — М.: Наука, 1991. — С. 91–146.
- Кулиев А.М., Дубинина И.Г., Гречанина Е.Я. и др.* Базовые уровни альфа-фетопротеина в зависимости от срока беременности // Вопр. охраны материнства и детства. — 1990. — №9. — С. 34–38.
- Курило Л.Ф.* Динамика преобразования хромосом в профазе мейоза в оогенезе человека // Цитология. — 1980. — Т. 22. — №1. — С. 154–160.
- Кухаренко В.И.* Клеточные и биохимические аспекты эмбриопатий человека с аномальным набором хромосом: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — М., 1995. — 47 с.
- Лазюк Г.И. (ред.).* Тератология человека. — М.: Медицина, 1979. — 440 с.
- Лазюк Г.И., Лурье И.В., Черствой Е.Д.* Наследственные синдромы множественных врожденных пороков развития. — М.: Медицина, 1983. — 208 с.
- Лазюк Г.И.* Этиология и патогенез врожденных пороков развития / В кн.: «Тератология человека». Под ред. Г.И.Лазюка. — М.: Медицина, 1991. — С. 18–46.
- Лापина Е.А., Кузнецова Т.В.* Особенности пролиферации цитотрофобласта ворсинчатого хориона плаценты человека // II съезд ВОГиС. Тезисы докладов. 1–5 февраля, 2000 г. — Санкт-Петербург, 2000. — С. 240.
- Ляпунова Н.А., Еголина Н.А., Викторов В.В.* Закономерности наследования полиморфных вариантов ядрышкообразующих хромосом человека // Хромосомы человека в норме и патологии: — М.: Наука, 1989. — С. 12–20.
- Материалы ВОЗ. Женева. Принципы оценки риска для потомства в связи с воздействием химических веществ в период беременности. — 1965, 1988, 1999.
- Машковский М.Д.* Лекарственные средства. — М., 1993.
- Медведев М.В. (ред.)* Пренатальная диагностика врожденных пороков развития в ранние сроки беременности. — М.: РАВУЗДПГ, Реальное время, 2000. — 160 с.
- Медведев М.В., Алтынник Н.А.* Длина костей носа плода в 12–14 недель беременности как пренатальный эхографический маркер хромосомных аномалий // Пренатальная диагностика. — 2003. — Т. 2. — №1. — С. 66–70.
- Медведев М.В., Юдина Е.А.* Пренатальная диагностика врожденных и наследственных болезней / В кн.: «Актуальные вопросы патологии родов, плода и новорожденного». — М., 2003. — С. 46–71.
- Мерфи Э.А., Чейз Г.А.* Основы медико-генетического консультирования. — М.: Медицина, 1979. — 398 с.
- Михайлов А.В.* Внутриматочные вмешательства под ультразвуковым контролем во время беременности / В кн.: «Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике». Под ред. В.В.Митькова, М.В.Медведева. — Т. 2. — М.: Видар, 1996. — С. 280–302.
- Михайлов А.В.* Клинико-патолофизиологические аспекты внутриматочных вмешательств в целях диагностики и лечения врожденных и наследственных заболеваний плода.: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — СПб., 1999. — 39 с.

Михайлов А.В., Константинова Н.Н., Пигина Т.В. Внутриматочные пере-ливания крови плоду как способ лечения отечной формы гемолитической болезни // Акуш. и гинек. — 1990. — №7. — С. 41—45.

Назаренко С.А. Изменчивость хромосом и развитие человека. — Томск: Томский университет, 1993. — 200 с.

Назаренко С.А., Васильева Е.О. Тест-система внешнего контроля качества цитогенетических исследований в учреждениях медико-генетической службы: Пособие для врачей. — Томск: Печатная мануфактура, 2003. — 34 с.

Назаренко С.А., Саженова Е.А. Однородительские дисомии и болезни геномного импринтинга. — Томск: Печатная мануфактура, 2004. — 37 с.

Назаренко С.А., Яковлева Ю.С. Цитогенетика человека и хромосомные болезни. — Томск: SST, 2001. — 83 с.

Некрасова Е.С. Комбинированный ультразвуковой и биохимический скрининг хромосомной патологии плода в первом триместре беременности у женщин Северо-Западного региона России: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб, 2005. — 20 с.

Некрасова Е.С., Талантова О.Е., Коротеев А.Л., Баранов В.С. Случай пренатальной диагностики множественных пороков развития плода в конце первого триместра беременности // Пренатальная диагностика. — 2004. — Т. 3. — №2. — С. 110—114.

Немилова Т.К., Воронин Д.В., Михайлов А.В. и др. Антенатальная диагностика и тактика при врожденных пороках развития плода и новорожденного. Методическое пособие. — СПб: СПГМУ, 2002. — 72 с.

Никитин А.И., Воробьева О.А. Факторы регуляции дифференцировки соматических клеток фолликулов яичников млекопитающих // Цитология. — 1988. — Т. 30. — №10. — С. 1155—1171.

Новиков П.В. Принципы организации медико-генетической помощи детям с наследственной патологией / В кн: «Диагностика и лечение врожденных и наследственных заболеваний у детей. Путеводитель по клинической генетике». — М.: Триада-Х, 2004. — С. 489—504.

Новиков П.В., Вельтищев Ю.Е. Роль наследственности в патологии детского возраста: методы, диагностики, терапии, профилактики. Лекции для врачей. — М., 2002. — 81 с.

О системе пренатальной диагностики врожденных пороков развития методами эхографии. Информационное письмо. — СПб, 2003. — 16 с.

Осиновская Н.С., Иващенко Т.Э., Соболева Е.Л. и др. Спектр мутационных повреждений гена 21-гидроксилазы у больных с адреногенитальным синдромом // Генетика. — 2000. — №8. — С. 1147—1149.

Пендина А.А., Ефимова О.А., Каминская А.Н. и др. Иммуноцитохимический анализ статуса метилирования метафазных хромосом человека // Цитология. — 2005. — Т. 47. — №8. — С. 731—737.

Пендина А.А., Гринкевич В.В., Кузнецова Т.В., Баранов В.С. Метилирование ДНК — универсальный механизм регуляции активности генов // Экологическая генетика. — 2004. — Т. 2. — №1. — С. 27—37.

Перспективы медицинской генетики / Под ред. Н.П.Бочкова. — М.: Медицина, 1982. — 400 с.

Посисеева Л.В. Специфический трофобластический бета-гликопротеин в акушерской практике // Акуш. и гинек. — 1986. — №10. — С. 6—8.

Прокофьева-Бельговская А.А. Основы цитогенетики человека. — М.: Медицина, 1969. — 544 с.

Пэттен Б. Эмбриология человека. — М.: Медицина, 1959. — 467 с.

Розовский В.С., Казы З., Бахарев В.А. Определение пола плода в первом триместре беременности // Акуш. и гинек. — 1980. — №8. — С. 35–37.

Романенко О.П. Состояние и пути оптимизации медико-генетической помощи детскому населению в условиях мегаполиса: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — СПб., 2002. — 44 с.

Романенко О.П., Клоева С.К. Врожденные пороки развития. — СПб: Изд-во СПб МАПО, 2004. — 70 с.

Рубцов Н.Б. Системы идентификации гомологичных районов хромосом: сравнительная цитогенетика млекопитающих и хромосомные патологии человека: Автореф. ... докт. биол. наук. — Новосибирск, 1996. — 48 с.

Рубцов Н.Б. Хромосомы млекопитающих: методы цитогенетического анализа: Учеб. пособие. — Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т, 2004. — Ч. 1. — 108 с.

Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В., Гайнер Т.А. Современные методы молекулярно-цитогенетического анализа и диагностика хромосомной патологии / В кн.: «Геномика — медицине». — М.: Академкнига, 2005. — С. 219–244.

Рубцов Н.Б., Протопопов А.И., Матвеева В.Г. и др. Быстрое кариотипирование клеток млекопитающих // Генетика. — 1994. — Т. 30. — №1. — С. 66–71.

Светлаков А.В., Яманова М.В., Базина М.И., Климова З.А. Профилактическая программа по снижению перинатальной смертности (метод. рекоменд.). — Красноярск, 1997. — 31 с.

Светлов П.Г. Теория критических периодов развития и ее значение для понимания принципов действия среды на онтогенез / В кн.: «Вопросы цитологии и общей физиологии». — М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1960. — С. 263–285.

Семейный кодекс Российской Федерации от 29.12.1995 г. — №223-ФЗ. — М., 2004.

Семенова-Тянь-Шанская А.Г., Кнорре А.Г. Половой зачаток (гонобласт), его происхождение и эволюция // Архив анат. гистол. эмбриол. — 1972. — Т. 8. — №1. — С. 29–40.

Снайдерс Р.Дж.М., Николаидес К.Х. Ультразвуковые маркеры хромосомных дефектов плода. — М.: Видар. — 1997. — 192 с.

Стародубов В.И. Медико-социальные приоритеты сохранения здоровья населения России на 2004–2010 гг. // Материалы сессии РАМН. — 2003. — С. 23.

Стрельников В.В., Залетаев Д.В. Патогенетическая роль повторяющихся последовательностей генома / В кн.: «Введение в молекулярную медицину». Под ред. М.А.Пальцева. — М.: Медицина, 2004. — 496 с.

Татаринев Ю.С. Обнаружение эмбриоспецифического альфа-глобулина в сыворотке крови больных первичным раком печени // Вопр. мед. химии. — 1964. — Т. 10. — С. 90–91.

Федорова М.В., Калашникова Е.П. Плацента и ее роль при беременности. — М.: Медицина, 1986. — 256 с.

Фозель Ф., Мотульски А. Генетика человека. Пер. с англ. — В 3 томах. — Том 2. — М.: Мир, 1989. — 313 с.

Хэдден Д.Р. Эндокринные заболевания и болезни обмена / В кн.: «Дородовое консультирование». Пер. с англ. — М., 1985. — С. 28.

Чеботарь Н.А., Конописцева Л.А., Игнатьева Т.В. и др. Роль генотипа матери в реализации эмбриотоксической активности тератогенов // Цитология и генетика. — 1994. — Т. 28. — №5. — С. 77–80.

Штильбанс И.И. Болезнь Дауна / В кн.: «Хромосомные болезни человека. Диагностика и клиника». Под. ред. член-корр. АМН СССР Е.Ф.Давиденковой. — Медицина. Лен.отд., 1965. — С. 56–78.

Юдина Е.А., Медведев М.В. (ред.) Основы пренатальной диагностики. — М.: Реальное Время, 2002. — 184 с.

Abbas, Sebire NJ, Johnson M et al. Maternal serum concentrations of pregnancy associated placental protein A and pregnancy specific beta-1-glycoprotein in multifetal pregnancies before and after fetal reduction // *Hum. Reprod.* — 1996. — Vol. 11. — P. 900–902.

Abelev G.I., Assecritova I.V., Kraevsky N.A. et al. Embryonal serum alpha-globulin in cancer patients: diagnostic value // *Int. J. Cancer.* — 1967. — Vol. 2. — P. 551–558.

Abruzzo M.A., Hassold T.J. Etiology of nondisjunction in humans // *Envir. Mol. Mutagen.* — 1995. — Vol. 25. — №26. — P. 38–47.

Adinolfi M., Sherlock J. First trimester prenatal diagnosis using transcervical cells: an evaluation // *Hum. Reprod. Update.* — 1997, Jul.–Aug. — Vol. 3 (Suppl. 4). — P. 383–392.

Aitken D.A., McKinnon D., Crossley J.A. et al. Changes in the maternal serum concentrations of PAPP-A and SP-1 in Down's syndrome pregnancies between the first and second trimesters // *J. Med. Genet.* — 1994. — Vol. 31. — P. 170.

Aitken D.A., Wallace E.M., Crossley J.A. et al. Dimeric inhibin A as a marker for Down's syndrome in early pregnancy // *N. Engl. J. Med.* — 1996. — Vol. 334. — P. 1231–1236.

Aller V., Gargallo M., Abrisqueta J. Familial transmission of a duplication-deficiency X chromosome associated with partial Turner syndrome // *Clinic. Genet.* — 1995. — Vol. 48. — №6. — P. 317–320.

Alter B., Modell B., Fairweather D. et al. Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies: a review of 15 cases // *New Engl. J. Med.* — 1976. — Vol. 295. — P. 1437–1439.

Anderson A.B.M., Webb R., Turnbull A.C. Oestrogens and parturition // *J. Endocrinol.* — 1981. — Vol. 89 (Suppl.). — P. 103–117.

Angel J.L., O'Brien W.F., Michelson J.A. et al. Instructional model for percutaneous fetal umbilical blood sampling // *Obstet. Gynecol.* — 1989. — Vol. 73. — P. 669.

Anshan Department of Obstetrics and Gynecology, Tietung Hospital of Anshan Iron and Steel Co. China. Fetal sex prediction by sex chromatin of chorion cells sampling during early pregnancy // *Chinese Medical. J.* — 1975. — Vol. 1. — №2. — P. 117–126.

Antolin E., Comas C., Torrents M. et al. The role of ductus venosus blood flow assessment in screening for chromosomal abnormalities at 10–16 weeks of gestation // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* — 2001. — Vol. 17. — P. 295–300.

Antsakis A.L., Papantoniou N.E., Mesogilitis S.A. et al. Cardiocentesis: An alternative method of fetal blood sampling for the prenatal diagnosis of hemoglobinopathies // *Obstet. Gynecol.* — 1992. — Vol. 79. — P. 630.

Audibert F., Benchimol Y., Benattar C. et al. Prediction of preeclampsia or intrauterine growth restriction by second trimester serum screening and uterine Doppler velocimetry // *Fetal. Diagn. Ther.* — 2005. — Vol. 20. — №1. — P. 48–53.

Bajoria R., Kingdom J. The case for routine determination of chorionicity and zygosity in multiple pregnancy // *Prenat. Diagn.* – 1997. – Vol. 17. – №13. – P. 1207–1225.

Barkai G., Goldman B., Ries L. et al. Down's syndrome screening marker levels following assisted reproduction // *Prenat. Diagn.* – 1996. – Vol. 16. – P. 1111–1114.

Bartels I., Lindemann A. Maternal levels of pregnancy-specific beta-1-glycoprotein (SP-1) are elevated in pregnancies affected by Down's syndrome // *Hum. Genet.* – 1988. – Vol. 80. – P. 46–48.

Beekhuis J.R. Maternal serum screening for fetal Down's syndrome and neural tube defects. A prospective study, performed in the north of the Netherlands. – Groningen, 1993. – 115 p.

Benn P.A. Preliminary evidence for associations between second trimester human chorionic gonadotropin and unconjugated oestriol levels with pregnancy outcome in Down's syndrome pregnancies // *Prenat. Diagn.* – 1998. – Vol. 18. – №4. – P. 319–321.

Benn P.A., Collins R. Evaluation of effect of analytical imprecision in maternal serum screening for Down's syndrome // *Ann. Clin. Chem.* – 2001. – Vol. 38. – P. 28–36.

Berry E., Aitken D.A., Crossley J.A. et al. Screening for Down's syndrome: changes in marker levels and detection rates between first and second trimesters // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* – 1997. – Vol. 104. – P. 811–817.

Bersinger N.A., Brizot M.L., Johnson A. et al. First trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein A and pregnancy-specific beta-1-glycoprotein in fetal trisomies // *Brit. J. Obstet. Gynaecol.* – 1994. – Vol. 101. – P. 970–974.

Bersinger N.A., Wunder D., Vanderlick F. et al. Maternal serum levels of placental proteins after in vitro fertilization and their implications for prenatal screening // *Prenat. Diagn.* – 2004. – Vol. 24. – №6. – P. 471–477.

Bersinger N.A., Brandenberger A.W., Birkhuser M.H. Endometrial and placental protein markers and ovarian steroids in serum during in-vitro fertilization cycles // *Hum. Reprod.* – 1995. – Vol. 10. – №8. – P. 2149–2154.

Bevis D.C.A. Composition of liquor amnii in haemolytic disease of newborn // *J. Obstet. Gynecol. Br. Commonwealth.* – 1953.

Bewley S., Roberts L.J., Mackinson A.M., Rodeck C.H. First trimester fetal nuchal translucency: problems with screening the general population // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* – 1995. – Vol. 2. – P. 386–388.

Bick D.P., McCorkle D., Stanley W.S. et al. Prenatal diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome in a pregnancy with low maternal serum oestriol and a sex-reversed fetus // *Prenat. Diagn.* – 1999. – Vol. 19. – №1. – P. 68–71.

Bilardo C.M., Muller M.A., Zikuling L. et al. Ductus venosus studies in fetuses at high risk of chromosomal or heart abnormalities: relationship with nuchal translucency measurement and fetal outcome // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2001. – Vol. 17. – P. 288–294.

Bindra R., Health V., Liao A.W. et al. One stop clinic for assessment of risk for trisomy 21 at 11–14 weeks: a prospective study of 15030 pregnancies // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 219–225.

Birken S. Chemistry of human choriogonadotropin // *Ann. Endocrinol.* – 1984. – Vol. 45. – P. 297–305.

Bischof P. Placental proteins // *Contrib. Gynecol. Obstetr.* – 1984. – Vol. 12. – P. 41–73.

Bischoff F.Z., Zenger-Hain J., Moses D. et al. Mosaicism for trisomy 12: four cases with varying outcomes // *Prenat. Diagn.* – 1995. – Vol. 15. – №11. – P. 1077–26.

Blithe D.L., Iles R.K. The role of glycosylation in regulating the glycoprotein hormone free alpha-subunit and free beta-subunit combination in the extraembryonic coelomic fluid of early pregnancy // *Endocrinology.* – 1995. – Vol. 136. – P. 903–910.

Blumenthal A., Allanson J. Turner syndrome in a mother and daughter: r(X) and fertility // *Clin. Genet.* – 1997. – Vol. 52. – №3. – P. 187–191.

Boehm F.H., Salyer S.L., Dev V.G. et al. Chorionic villus sampling: Quality control-m-A continuous improvement model // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1993. – Vol. 168. – P. 1766–1777.

Bogart M.H., Pandian M.R., Jones O.W. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosomes abnormalities // *Prenat. Diagn.* – 1987. – Vol. 7. – P. 623–630.

Boorstein W.R., Vamvakopoulos N.C., Fiddes J.C. Human chorionic β -gonadotropin-subunit is encoded by at least eight genes arranged in tandem, inverted pairs // *Nature.* – 1982. – Vol. 300. – P. 419–422.

Boothby M., Kukowska J., Boime I. Imbalanced of human choriogonadotropin alpha, beta subunits reflects the steady state levels of the corresponding mRNAs // *JBC.* – 1983. – Vol. 258. – P. 9250–9253.

Boué A. Fetal medicine: Prenatal diagnosis and management. – N.Y.: Oxford Univ. Press, 1995. – 292 p.

Boué A., Gallano P. A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1,356 prenatal diagnoses // *Prenat. Diagn.* – 1984. – Vol. 4 (spec. issue). – P. 45–67.

Boulout P., Deschamps F., Lefort G. et al. Pure fetal blood samples obtained by cordocentesis: technical aspects of 322 cases // *Prenat. Diagn.* – 1990. – Vol. 10. – P. 93–98.

Brace R.A. Amniotic fluid dynamics / In: «Maternal and fetal medicine». R.Creasy, R.Resnik (Eds). – Philadelphia: Saunders, 1988. – P. 128–135.

Brajenovic-Milic B., Tislaric D., Zuvic-Butorac M. et al. Elevated second-trimester free beta-HCG as an isolated finding and pregnancy outcomes // *Fetal. Diagn. Ther.* – 2004. – Vol. 19. – P. 483–487.

Brambati B., Lanzani A., Tului L. Ultrasound and biochemical assessment of first trimester pregnancy. / In: «The embryo: normal and abnormal development and growth». M.Chapman, G.Grudzinskas, T.Chard (eds). – NY: Springer-Verlag, 1991. – P. 181–194.

Brambati B., Macintosh M.C., Teisner B. et al. Low maternal serum level of pregnancy associated plasma protein (PAPP-A) in the first trimester in association with abnormal fetal karyotype // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* – 1993. – Vol. 100. – P. 324–326.

Brambati B., Oldrini A., Ferrazzi E., Lanzani A. Chorion villus sampling: an analysis of the obstetrics experience of 1000 cases // *Prenatal. Diagn.* – 1987. – Vol. 7. – P. 157–169.

Brambati B., Oldrini A. Methods of chorion villi sampling / In: «Chorion villus sampling». B.Brambati (Ed.). – NY: Livingstone, 1986. – P. 73–97.

Brambati B., Simoni G., Danesino C. First trimester fetal diagnosis of genetic disorders: clinical evaluation of 250 cases // *J. Med. Genet.* – 1985. – Vol. 22. – P. 92–99.

- Breed A.S.P.M.* An evaluation of cytogenetic diagnosis by chorion villus sampling: reliability and implications. — Groningen: STYX, 1992. — 175 p.
- Brenner N.A., Wolny Y.M., Barritt J.A. et al.* Mitochondrial DNA deletion in human oocytes and embryos // *Mol. Hum. Reprod.* 1998, 4, 9, 887–892.
- Bresson J., Fellmann F., Schaal J.* Diagnosis of Turner's syndrome in a pregnant woman // *Cytogenet. Cell Genet.* 1st European Cytogenetics Conference. Athens, Greece. — June 22–25. — 1997. — Vol. 77. — №1–2. — P. 103.
- Brizot M.L., Heyett J.A., McKie A.T. et al.* Gene expression of human pregnancy-associated plasma protein-A in placenta with trisomic pregnancies // *Placenta.* — 1996. — Vol. 17. — P. 33–36.
- Brock D.H.J., Sutcliffe R.G.* Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida // *Lancet.* — 1972. — Vol. 1. — P. 197–199.
- Brock D.J.H., Bolton A.E., Monaghan J.M.* Prenatal diagnosis of anencephaly through maternal serum alpha-fetoprotein measurement // *Lancet.* — 1973. — Vol. 2. — P. 943–944.
- Brownbill P., Edwards D., Jones C. et al.* Mechanisms of alpha-fetoprotein transfer in the perfused human placental cotyledon from uncomplicated pregnancy // *J. Clin. Invest.* — 1995. — Vol. 96. — №5. — P. 2220–2226.
- Burne D.L., Penna L., Marks K., Offley-Shore B.* First trimester amniofiltration: technical, cytogenetic and pregnancy outcome of 104 consecutive procedure // *Br. J. Obstet. Gynecol.* — 1995. — Vol. 102. — P. 220–223.
- Butler M., Dev V., Shan D. et al.* The use of early simultaneous percutaneous umbilical blood sampling (PUBS) and amniocentesis for prenatal Fragile X chromosome diagnosis // *Amer. J. Med. Genet.* — 1988. — Vol. 31. — №4. — P. 775–778.
- Calton M.* DNA content of placental nuclei // *J. Cell Biol.* — 1962. — Vol. 13. — №2. — P. 87–93.
- Campbell S., Mavrides E., Perfumo F. et al.* Prenatal diagnosis of mosaic trisomy 8 in a fetus with normal nuchal translucency thickness and reversed end-diastolic ductus venosus flow // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* — 2001. — Vol. 17. — P. 341–343.
- Canick J.A., Kellner L.H., Cole L.A., Cuckle H.S.* Urinary analyte screening: a noninvasive detection method for Down syndrome? // *Mol. Med. Today.* — 1999. — Vol. 5. — №2. — P. 68–73.
- Canick J.A., Knight G.J., Palomaki G.E. et al.* Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* — 1988. — Vol. 95. — P. 330–333.
- Canick J.A., Knight G.L. et al.* Second trimester diurnal variation of maternal serum alpha-fetoprotein, human chorionic gonadotropin and unconjugated oestriol: is it present and does it affect the prediction of a patient risk for fetal Down syndrome // *Prenat. Diagn.* — 1994. — Vol. 14. — №10. — P. 947–951.
- Canini S., Prefumo F., Famularo L. et al.* Comparison of first trimester, second trimester and integrated Down's syndrome screening results in unaffected pregnancies // *Clin. Chem. Lab. Med.* — 2002. — Vol. 40. — №6. — P. 600–603.
- Cans C., Cohen O., Lavergne C. et al.* Logistic regression model to estimate the risk of unbalanced offspring in reciprocal translocations // *Hum. Genet.* — 1993. — Vol. 92. — №6. — P. 598–604.
- Carrera J.M., Di Renzo G.C. (eds).* Recommendations and protocols for prenatal diagnosis. — Barcelona: Salvat Editores, 1993. — 52 p.
- Carroll R.S., Kowach P.M., Lofgren J.A. et al.* In vivo regulation of FSH synthesis by inhibin and activin // *Endocrinology.* — 1991. — Vol. 129. — P. 3299–3304.

Casal M.L., Wolfe J.H. In utero transplantation of fetal liver cells in mucopolysaccharidosis type VII mouse results in low-level chimerism, but overexpression of beta-glucuronidase can delay onset of clinical signs // *Blood*. – 2001. – Vol. 97 (Suppl. 6). – P. 1625–1634.

Caspari D., Bartels I., Rauskolb R. Discrepant karyotypes after second and third trimester combined placentocentesis / amniocentesis // *Prenat. Diagn.* – 1994. – Vol. 14. – №7. – P. 569–576.

Chang J.-M., Roman C., Heymann M.A. Effect of endothelium-derived relaxing factor inhibition on the umbilical circulation in fetal lamb in utero // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1992. – Vol. 166. – P. 727–734.

Chen C.L. Editorial: inhibin and activin as paracrine and autocrine factors // *Endocrinology*. – 1993. – Vol. 132. – P. 4–5.

Chitayat D., Farrell S.A., Huang T. et al. Double-positive maternal serum screening results for Down syndrome and open neural tube defects: An indicator for fetal structural or chromosomal abnormalities and adverse obstetric outcomes // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2002. – Vol. 187. – №3. – P. 758–763.

Chitkara U., Lee L., Oehlert J.W. et al. Fetal ear length measurement: a useful predictor of aneuploidy? // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2002. – Vol. 19. – P. 131–135.

Christian S.L., Smith A.C., Macha M. et al. Prenatal diagnosis of uniparental disomy 15 following trisomy 15 mosaicism // *Prenat. Diagn.* – 1996. – Vol. 16. – №4. – P. 323–332.

Christiansen M., Larsen S.O., Oxvig C. et al. Screening for Down's syndrome in early and late first and second trimester using six maternal serum markers // *Clin. Genet.* – 2004. – Vol. 65 (Suppl. 1). – P. 11–16.

Christiansen M., Larsen S.O. An increase in cost-effectiveness of first trimester maternal screening programmes for fetal chromosome anomalies is obtained by contingent testing // *Prenat. Diagn.* – 2002. – Vol. 22 (Suppl. 6). – P. 482–486.

Chudoba I., Franke Y., Senger G. et al. Maternal UPD 20 in a hyperactive child with severe growth retardation // *Eur. J. Hum. Genet.* 1999. – Vol. 7. – №5. – P. 533–540.

Cicero S., Bindra R., Rembouskos G. et al. Integrated ultrasound and biochemical screening for trisomy 21 using fetal nuchal translucency, absent fetal nasal bone, free beta-hCG and PAPP-A at 11–14 weeks // *Prenat. Diagn.* – 2003. – Vol. 23. – P. 306–310.

Cicero S., Curcino P., Papageorgiou A. et al. Absence of nasal bones in fetuses with trisomy 21 at 11–14 weeks of gestation: an observational study // *Lancet*. – 2001. – Vol. 358. – P. 1665–1667.

Cicero S., Curcio P., Rembouskos G. et al. Maxillary length at 11–14 weeks of gestation in fetuses with trisomy 21 // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2004. – Vol. 24. – P. 19–22.

Cicero S., Dezerega V., Andrade E. et al. Learning curve for sonographic examination of the fetal nasal bone at 11–14 weeks // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2003a. – Vol. 22. – P. 135–137.

Cicero S., Longo D., Rembouskos G. et al. Absent nasal bone at 11–14 weeks of gestation and chromosomal defects // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2003b. – Vol. 22. – P. 31–35.

Claussen U., Klein R., Schmidt M. A pipette method for rapid karyotyping in prenatal diagnosis // *Prenat. Diagn.* – 1986. – Vol. 6. – №6. – P. 401–408.

Claussen U., Ulmer R., Beinder E., Voigt H.-J. Rapid karyotyping in prenatal diagnosis: a comparative study of the 'pipette method' and the 'in situ' technique for

chromosome harvesting // *Prenat. Diagn.* – 1993. – Vol. 13. – №12. – P. 1085–1093.

Collier J., Vallance P. Physiological importance of nitric oxide. An endogenous nitrovasodilator // *Br. J. Med.* – 1991. – Vol. 302. – P. 1289–1290.

Cotter A.M., Martin C.M., O'Leary J.J., Daly S.F. Increased fetal DNA in the maternal circulation in early pregnancy is associated with an increased risk of preeclampsia // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2004. – Vol. 191. – №2. – P. 515–520.

Coutelle Ch., Themis M., Waddington S. et al. The hopes and fears of in utero gene therapy for genetic disease // *Placenta.* – 2003. – Vol. 24. – P. 114–121.

Craig K., Pinette MG, Blackstone J. et al. Highly abnormal maternal inhibin and beta-human chorionic gonadotropin levels along with severe HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count) syndrome at 17 weeks' gestation with triploidy // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2000, Mar. – Vol. 182 (Suppl. 3). – P. 737–739.

Crandall B.F., Leberherz T.B., Rubinsten L. et al. Chromosome findings in 2500 second trimester amniocentesis // *Am. J. Med. Genet.* – 1980. V. 5. – №4. – P. 345–356.

Crane J.P., Cheung S.W. An embryonic model to explain cytogenetic inconsistencies observed in chorionic villus versus fetal tissue // *Prenat. Diagn.* – 1988. – Vol. 8. – №2. – P. 119–129.

Crossley J.A., Aitken D.A., Waugh S.M. et al. Maternal smoking: age distribution, levels of alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotrophin, and effect on detection of Down syndrome pregnancies in second-trimester screening // *Prenat. Diagn.* – 2002. – Vol. 22. – №3. – P. 247–255.

Cuckle H. Time for total shift to first-trimester screening for Down's syndrome // *Lancet.* – 2001. – Vol. 358. – P. 1658–1659.

Cuckle H., Arbutova S. Multyanalyte maternal serum screening for chromosomal defects / In: «Genetic Disorders and the fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment» (5th edn). A.Milunsky (Ed.). – John Hopkins Univ. Press, 2004. – P. 795–835.

Cuckle H.S., Spencer K., Nikolaidis K.H. Down syndrome screening marker levels in women with a previous aneuploidy pregnancy // *Prenat. Diagn.* – 2005. – Vol. 25. – P. 47–50.

Cuckle H.S., van Lith J.M. Appropriate biochemical parameters in first-trimester screening for Down's syndrome // *Prenat. Diagn.* – 1999. – Vol. 19. – P. 505–512.

Cuckle H.S., Wald N.J. HCG, estriol and other maternal blood markers of fetal aneuploidy / In: «Maternal serum screening for fetal genetic disorders». S.Elias, J.L.Simpson (Ed.). – NY: Churchill Livingstone. – 1992. – P. 87–107.

Cuckle H.S., Wald N.J., Lindenbaum R.H. Maternal serum alpha-fetoprotein measurement: a screening test for Down's syndrome // *Lancet.* – 1984. – Vol. 1. – P. 926–929.

Cuckle H.S., Wald N.J., Thompson S. Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and a serum alpha-fetoprotein // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* – 1987. – Vol. 94. – P. 387–402.

Czeizel A.E., Rockenbauer M. et al. A population-based case teratologic study of ampicillin treatment during pregnancy // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2001. – Vol. 185 (Suppl. 1). – P. 140–147.

Daffos F., Capella-Pavlovsky M., Forestier F. Fetal blood sampling via the umbilical cord using a needle guided by ultrasound. Report of 66 cases // *Prenat. Diagn.* – 1983. – Vol. 3. – P. 271–277.

Daniel A., Hook E. B., Wulf G. Risk of unbalanced progeny at amniocentesis to carriers of chromosome rearrangements: data from United States and Canadian Laboratories // *Am. J. Med. Genet.* – 1989. – Vol. 31. – №1. – P. 14–53.

Dernburg A.F., Sedat J.W., Hawley R.S. Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation // *Cell.* – 1996. – Vol. 86. – №1. – P. 135–146.

Devriendt K. Genetic control of intra-uterine growth // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2000. – Vol. 92. – №1. – P. 29–34.

Ding Ch., Chiu R.W.K., Lo Y.M.D. MS analysis of single nucleotide differences in circulating nucleic acids: application to non-invasive prenatal diagnosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)*. – 2004. – Vol. 101. – №29. – P. 10762–10766.

Dolk H., Bernard F., Leshat M.F. Chorionic villus sampling and limb abnormalities // *Lancet.* – 1992. – Vol. 339. – P. 876–877.

Donnenfeld A.E., Icke K.V., Pargas C., Dowman C. Biochemical screening for aneuploidy in ovum donor pregnancies // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2002. – Vol. 187. – №5. – P. 1222–1225.

Down L.J. Observations on an ethnic classification of idiots. Clinical Lectures and Reports // *London Hospital.* – 1866. – Vol. 3. – P. 259–262.

Dugoff L., Hobbins J.C., Malone F.D. et al. First-trimester maternal serum PAPP-A and free-beta subunit human chorionic gonadotropin concentrations and nuchal translucency are associated with obstetric complications: a population-based screening study (the FASTER Trial) // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2004. – Vol. 191. – №4. – P. 1446–1451.

Eichenlaub-Ritter U. Genetics of oocyte aging // *Maturitas.* – 1998. – Vol. 30. – №2. – P. 143–169.

Einstein // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2004. – Vol. 191. – №3. – P. 1004–1008.

Endoh M., Kolbuchi N., Sato M. et al. Fetal gene transfer by intrauterine injection with microbubble-enhanced ultrasound // *Mol. Therapy.* – 2002. – Vol. 5. – №5. – P. 501–508.

EUCROMIC: Quality Guidelines and standards for Genetic laboratories / clinics in prenatal diagnosis on fetal samples obtained by invasive procedures // *Eur. J. Hum. Genet.* – 1998. – Vol. 5. – №6. – P. 342–350.

Evans M.I., Littmann L., Isada N.B., Jonson M.P. Multifetal pregnancy reduction and selective termination / In: «High risk in pregnancy. Management options». D.K.James, P.J.Steer, C.P.Weiner, B.Gonik (Eds.). – London, 1996. – P. 1023–1029.

Evans M.I., Liurba E., Landsberger E.J. et al. Impact of folic acid fortification in the United States: markedly diminished high maternal serum alpha-fetoprotein values // *J. Obstet. Gynecol.* – 2004. – 103 (3). – P. 474–479.

Exalto N., Rolland R., Eskes T.K.A.B., Vooijs G.P. Early pregnancy. – Boehringer Ingelheim, 1983. – 216 p.

Farina A., LeShane E. S., Lambert-Messerlian G.M. et al. Evaluation of cell-free fetal DNA as a second trimester serum marker of Down syndrome pregnancy // *Clin. Chem.* – 2003. – Vol. 49. – №2. – P. 239–242.

Firth H.V., Boyd P.A., Chamberline P. et al. Limb abnormalities and chorion villus sampling [Letter] // *Lancet.* – 1991b. – Vol. 338. – P. 51.

Firth H.V., Boyd P.A., Chamberline P. et al. Severe limb abnormalities after chorion villus sampling at 56–66 days gestation // *Lancet.* – 1991a. – Vol. 337. – P. 762–763.

Flake A.W. In utero stem cell transplantation. Best Practice & Res. // *Clin. Obstet. & Gynecol.* – 2004. – Vol. 18. – №6. – P. 941–958.

Florio P., Luisi S., Ciarmela P. et al. Inhibins and activins in pregnancy // *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* – 2004. – Vol. 89. – №9. – P. 4673–4677.

Fokstuen S., Ginsburg C., Zachmann M., Schinzel A. Maternal uniparental disomy 14 as a cause of intrauterine growth retardation and early onset of puberty // *J. Pediatr.* – 1999. – Vol. 134. – №6. – P. 689–695.

Fraser R.F. 2nd, McAsey M.E., Coney P. Inhibin-A and pro-alpha C are elevated in preeclamptic pregnancy and correlate with human chorionic gonadotropin // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 1998, Jul. – Vol. 40 (Suppl. 1). – P. 37–42.

Frishman G.N., Canick J.A., Hogan J.W. et al. Serum triple-marker screening in in-vitro fertilization and naturally conceived pregnancies // *Obstetr. Gynecol.* – 1997. – Vol. 90. – P. 98–101.

Froster U.G., Jackson L. Limb defects and chorionic villus sampling: Results from an international registry. 1992–1994 // *Lancet.* – 1996. – Vol. 347. – P. 489.

Garden A.S., Reid G., Benzie R.J. Chorion villus sampling // *Lancet.* – 1985. – Vol. 325. – P. 1270.

Ghizoni L., Ferrazzi E., Castagna C. et al. Prenatal diagnosis after ART success: the role of early combined screening tests in counselling pregnant patients // *Placenta.* – 2003. – Vol. 24 (Suppl. B). – S99-S103.

Gilpin B.J., Loechel F., Mattei M.G. et al. A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis *in vivo* // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 157–166.

Giovangrandi Y., Weiner C.P., Smoleniec J., Brettes J.P. Fetal infection / In: «High risk pregnancy». D.K.James, P.J.Steer, C.P.Weiner, B.Gonik (Eds). – London, 1996. – P. 841–870.

Glerup S., Boldt H.B., Overgaard M.T. et al. Proteinase inhibition by proform of eosinophil major basic protein (proMBP) is a multistep process of intra- and intermolecular disulfide rearrangements // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280 (Suppl. 11). – P. 9823–9832.

Goldberg M.F., Chen A., Ahn Y.W., Reidy J.A. First trimester prenatal diagnosis using endocervical lavage: a negative evaluation // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1980. – Vol. 138. – P. 436–439.

Goldie D.J., Astley J.P., Beamon J.M. et al. Screening for Down s syndrome: the first two years experience in Bristol // *J. Med. Screen.* – 1995. – Vol. 2. – P. 207–210.

Graf R., Langer J.U., Schonfelder G. et al. The endovascular contractile system in human placenta. Morphological and immunocytochemical investigation // *Anat. Embriol. Berl.* – 1994. – Vol. 190. – P. 561–568.

Gray C.J. Glycoprotein gonadotropins. Structure and synthesis // *Acta Endocrinol.* – 1988. – Vol. 288. – P. 20–27.

Griffin D.K. The incidence, origin and etiology of aneuploidy // *Int. Rev. Cytol.* – 1996. – Vol. 167. – P. 263–295.

Griffith-Jones M.D., Miller D., Lilford R.J. et al. Detection of fetal DNA in trans-cervical swabs from first trimester pregnancies by gene amplification: a new route to prenatal diagnosis? // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* – 1992, Jun. – Vol. 99 (Suppl. 6). – P. 508–511.

Gutierrez A., Grimalt L., Remohi J., Pellicer A. Twin pregnancy after oocyte donation in a woman with Turner syndrome // *Ginecol. Obstet. Mex.* – 1994. – Vol. 62. – P. 182–184.

Guttenbach M., Engel W., Schmid M. Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chro-

mosome aberration. A review // *Human. Genet.* – 1997. – Vol. 100. – №1. – P. 1–21.

Hackshaw A.K., Wald N.J. Assessment of the value of reporting partial screening results in prenatal screening for Down's syndrome // *Prenat. Diagn.* – 2001. – Vol. 21. – P. 737–740.

Haddow J.E., Palomaki G.E. Down's syndrome screening // *The Lancet.* – 1996. – Vol. 347. – P. 1625.

Haddow J.E., Palomaki G.E., Knight G.J. et al. Prenatal screening for Down's syndrome with the use of maternal serum markers // *N. Engl. J. Med.* – 1992. – Vol. 327. – P. 588–593.

Hahnemann N. Early prenatal diagnosis: A study of biopsy techniques and cell culturing from extra-embryonic membrane // *Clin. Genet.* – 1974. – Vol. 6. – №4. – P. 294–306.

Hahnemann N., Mohr J. Genetics diagnosis in the embryo by means biopsy from extra embryonic membranes // *Bull. Europ. Soc. Hum. Genet.* – 1968. – Vol. 2. – P. 29–32.

Handyside A.H., Kontogianni E.H., Hardy K., Winston R.M. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification // *Nature.* – 1990. Apr. 19;344 (6268):768–70.

Hanning I., Mires G.J. Triploid pregnancy detected incidentally by Down's syndrome screening // *Ann Clin Biochem.* – 2002. – Vol. 39 (Pt 2):157–9.

Harper M.E., Dugaiczak A. Linkage of evolutionary related serum albumin and alpha-fetoprotein genes within q11–22 of human chromosome 4 // *Am. J. Hum. Genet.* – 1983. – Vol. 35. – P. 565.

Harper P.S. Practical Genetic Counselling. – Arnold, London, 2003. – 364 p.

Hassold T., Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy // *Nat. Rev. Genet.* – 2001. – Vol. 2. – №4. – P. 280–291.

Hay D.L. Placental histology and the production of human choriogonadotropin and its subunits in pregnancy // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* – 1988. – Vol. 95. – P. 1268–1275.

Hecher K., Spensor R., Szalay S. The effect of cordocentesis on umbilical and middle cerebral artery blood flow velocity waveforms // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* – 1993. – Vol. 100. – P. 828–831.

Heinonen S., Hippelainen M., Ryyanen M. et al. Effect of in-vitro fertilization on human chorionic gonadotropin serum concentrations and Down's syndrome screening // *Fertil. Steril.* – 1996. – Vol. 66. – P. 398–403.

Herman A., Dreazen E., Tovbin J. et al. Comparison between disclosure and non-disclosure approaches for trisomy 21 screening tests // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17. – P. 1358–1362.

Herrou M., Lepourrier N., Leymarie P. Screening for fetal Down syndrome with maternal serum hCG and oestriol: a prospective study // *Prenat. Diagn.* – 1992. – Vol. 12. – P. 887–892.

Hillier S.G. Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries // *J. Endocrinol.* – 1991. – Vol. 131. – P. 171–175.

Hirahara F., Miyagi E., Yamanaka M. A case of tracheal agenesis delivered in patient with mosaic Turner's syndrome // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 1995. – Vol. 58. – №2. – P. 207–209.

Hirst M.C., Roche A., Flint T.J. et al. Linear order of new and established DNA markers around the fragile site at Xq27.3 // *Genomics.* – 1991. – Vol. 10 (1):243–9.

Hobbins J.C., Mahoney M. In utero diagnosis of hemoglobinopathies: technic for obtaining fetal blood // *New Engl. J. Med.* – 1974. – Vol. 290. – P. 1065–1067.

Holzgreve W., Zhong X.Y., Hahn S. Traffic of fetal cells and release of cell free DNA is elevated in preeclampsia / In: «Early Prenatal Diagnosis, Fetal Cells and DNA in the Mother. Present State and Perspectives». M.Macek, D.Bianchi, H.Cuckle (Eds). – Prague: The Carolinum. Press, 2002. – P. 160–168.

Holzgreve W., Hahn S., Tereanli S., Miny P. Prenatal diagnosis from maternal blood – present state of art. 5th European Cytogenetics Conference. – Madrid, 2005, June 4–7. – P. 8.

Holzgreve W., Miny P. Chorionic villus sampling and placental biopsy / In: «High Risk Pregnancy». D.K.James, P.J.Steer, C.P.Weiner, B.Gonik (Eds). – London, 1996. – P. 635–643.

Hsu L.Y., Yu M.T., Neu R.L. et al. Rare trisomy mosaicism diagnosed in amniocytes, involving an autosome other than chromosomes 13, 18, 20, and 21: karyotype / phenotype correlations // *Prenat Diagn.* – 1997. – Vol. 17. – №3. – P. 201–42.

Hsu L.Y.F. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis / In: «Genetic disorders and the fetus. Diagnosis, prevention, and treatment». A.Milunsky (Ed.). – Baltimore: The John Hopkins Univ. Press, 1992. – P. 155–210.

Huang T., Alberman E., Watt H.C., Wald N.J. Using Down syndrome serum screening results to predict low birthweight // *Prenat. Diagn.* – 2003. – Vol. 23. – №5. – P. 420–426.

Huttly W., Rudnicka A., Wald N.J. Second-trimester prenatal screening markers for Down's syndrome in women with insulin-dependent diabetes mellitus // *Prenat. Diagn.* – 2004. – Vol. 24. – №10. – P. 804–807.

Hyett J.A., Perdu M., Sharland G.K. et al. Increased nuchal translucency at 10–14 weeks of gestation as a marker for major cardiac defects // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 1997. – Vol. 10. – P. 242–246.

Illmensee K. Cloning in reproductive medicine // *J. Assisted Reproduction & Genetics.* – 2002. Vol. 18 (Suppl. 8). – P. 451–467.

International fetoscopic group. The status of fetoscopy and fetal tissue sampling // *Prenat. Diagn.* – 1984. – Vol. 4. – P. 79–81.

ISCN – An international system for human cytogenetic nomenclature (1995) / F.Miteman (ed.). – Basel: Karger, 1995. – 114 p.

Ishkanian A.S., Maloff C.A., Watson S.K. et al. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome // *Nat. Genet.* – 2004. – Vol. 36. – P. 299–303.

Jackson L.G., Wapner R.J. Risks of chorionic villus sampling // *Clin. Obstet. Gynec.* – 1987. – Vol. I. – P. 513.

Jackson-Cook C.K., Flannery D., Corey L. et al. Nucleolar organizer region as a risk factor for Down syndrome // *Am. J. Hum. Genet.* – 1985. – Vol. 37. – №. 6. – P. 1049–1061.

Jacobs P., Hassold T. The origin of numerical chromosome abnormalities // *Adv. Genet.* – 1995. – Vol. 33. – P. 101–133.

Jacobson C.B., Barter R.N. Intrauterine diagnosis and management of genetic defects // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1967. – Vol. 99. – P. 795–807.

James R.S., Temple J.K., Dennis N.R., Crolla J.A. A search for uniparental disomy in carriers of supernumerary marker chromosomes // *Eur. J. Hum. Genet.* – 1995. – Vol. 3. – №1. – P. 21–26.

Jeffcoat T.N.A., Flegner J.R.N., Russel S.N. et al. – Norwalk, 1991. – P. 93–108.

Jimener-Sanchez G., Childs B., Valle D. Human disease genes // *Nature.* – 2002. – V. 409, N6822, 853–855.

Jirasek J.E. Prenatal development: growth and differentiation / In: «Gynecology and Obstetrics» J.W.Sciarra (Ed.). – Philadelphia: Harper & Row Publ. – 1985. – Chapt. 14. – P. 1–11.

Johnson A., Wapner R.J., Jackson L.G. Mosaicism in chorionic villus sampling: an association with poor perinatal outcome // *Obstet. Gynecol.* – 1990. – Vol. 75. – №4. – P. 573–577.

Kabili G., Stricker R., Stricker R. et al. First trimester screening for trisomy 21; Do the parameters used detect more pathologies than just Down syndrome? // *Eur. J. Obstetr. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2004. – Vol. 114. – №1. – P. 38.

Kalish R.B., Gupta M., Perni S.C. et al. Clinical significance of first trimester crown-rump length disparity in dichorionic twin gestations // *Am. J. Obstetr. Gynecol.* – 2004. – Vol. 191. – №4. – P. 1437–1440.

Kalousek D.K. Insights into intrauterine placental and fetal relationships from the cytogenetic perspective // *Cs. Pediatr.* – 1997. – Vol. 52. – №7. – P. 523–529.

Kalousek D.K., Barrett I. Genomic imprinting related to prenatal diagnosis // *Prenat. Diagn.* – 1994. – Vol. 14. – P. 1191–1201.

Kalter H., Warkany J. Medical progress. Congenital malformations: etiologic factors and their role in prevention (first of two parts) // *N. Engl. J. Med.* – 1983. – Vol. 308. – №8. – P. 424–431.

Kan Y.W., Valenti C., Guidotti R. et al. Fetal blood sampling in utero // *Lancet.* – 1974. – Vol. 1. – P. 79–80.

Kanellopoulos V., Kastetos C., Economides D.L. Examination of fetal nasal bone and repeatability of measurement in early pregnancy // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2003. – Vol. 22. – P. 131–134.

Kaplowitz P.B., Bodurtha J., Brown J., Spence J. E. Monozygotic twins discordant for Ulrich–Turner syndrome // *Am. J. Med. Genet.* – 1991. – Vol. 41. – №1. – P. 78–82.

Kascheeva T., Vakharlovsky V., Vokhmyanina N. et al. Maternal serum markers in North-West Russia // *Down's screening news.* – 2003. – Vol. 10. – №2. – P. 30–31.

Kascheeva T., Vakharlovskiy V., Paikacheva Yu., Arzhanova O. Serum markers in pregnancy after in vitro fertilisation // *Eur J. of Hum. Genet.* – 2001. – V. 9 (Suppl.1). – P. 228.

Kazy Z., Rozovsky I.S., Bakharev V.A. Chorion biopsy in early pregnancy: a method for early prenatal diagnosis for inherited disorders // *Prenat. Diagn.* – 1982. – Vol. 2. – P. 39–45.

Keeling J.W., Hansen B.F., Kjaer I. Pattern of malformation in the axial skeleton in human trisomy 21 fetuses // *Amer. J. med. genet.* – 1997. – Vol. 68. – P. 466–471.

Kellner L.H., Canick J.A., Palomaki G.E. et al. Levels of urinary beta-core fragment, total oestriol, and the ratio of the two in second-trimester screening for Down syndrome // *Prenat. Diagn.* – 1997. – Vol. 17. – №12. – P. 1135–1141.

Kennerknecht I., Baur-Aubele S., Vogel W. Proliferation kinetics in native chorionic villus cell // *Prenat. Diagn.* – 1991. – Vol. 11. – №8. – P. 591–595.

Kerem B.S., Rommens J.M., Buchanan J.A. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis // *Science.* – 1989. – Vol. 245. – P. 1073–1080.

Keren D.F., Canick J.A., Johnson M.Z. et al. Low maternal serum unconjugated oestriol during prenatal screening as an indication of placental steroid sulfatase deficiency and X-linked ichthyosis // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1995. – Vol. 103. – №4. – P. 400–403.

Khastgir G., Abdalla H., Thomas A. Oocyte donation in Turner's syndrome an analysis of the factors affecting the outcome // *Hum. Reprod.* – 1997. – Vol. 12. – №2. – P. 279–285.

Kim S.Y., Kim S.K., Lee J.S. et al. The prediction of adverse pregnancy outcome using low unconjugated estriol in the second trimester of pregnancy without risk of Down's syndrome // *Yonsei Med. J. (Korea).* – 2000. – Vol. 41. – №2. – P. 226–229.

Kleim M. et al. Proliferative activity in ectopic trophoblastic tissue // *Hum. Reprod.* – 1995. – Vol. 10. – №9. – P. 2441–2444.

Knight G.J., Palomaki G.E., Neveux L.M. et al. HCG and the free beta-subunit as screening tests for Down syndrome // *Prenat. Diagn.* – 1998. – Vol. 18. – №3. – P. 235–245.

Knutsen T., Bixenman H.A., Lawce H., Martin P.K. Chromosome analysis guidelines – preliminary report // *Cytogen. Cell Genet.* – 1990. – Vol. 54. – №1–2. – P. 1–4.

Kornman L.H., Morssink L.P., Beekhuis J.R. et al. Nuchal translucency can not be used as a screening test for chromosomal abnormalities in the first trimester of pregnancy in a routine ultrasound practice // *Prenat. Diagn.* – 1996. – Vol. 16. – P. 797–805.

Kotzot D., Balmer D., Baumer A. et al. Maternal uniparental disomy 7 – review and further delineation of the phenotype // *Eur. J. Pediatr.* – 2000. – Vol. 159. – №4. – P. 247–256.

Krantz D., Goetzl L., Simpson J.L. et al. Association of extreme first-trimester free human chorionic gonadotropin-beta, pregnancy-associated plasma protein A, and nuchal translucency with intrauterine growth restriction and other adverse pregnancy outcomes // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2004. – Vol. 191. – №4. – P. 1452–1458.

Krantz D.A., Hallagan T.W., Orlandi F. et al. First trimester Down's syndrome screening using dried blood biochemistry and nuchal translucency // *Obstet. Gynecol.* – 2000. – Vol. 96. – P. 207–213.

Kratzer P.G., Golbus M.S., Finkelstein D.E. et al. Trisomic pregnancies have normal human chorionic gonadotropin bioactivity // *Prenat. Diagn.* – 1991. – Vol. 11. – P. 1–6.

Kuchinka B.D., Barrett I.J., Moya G. et al. Two cases of confined placental mosaicism for chromosome 4, including one with maternal uniparental disomy // *Prenat. Diagn.* – 2001. – Vol. 21. – №1. – P. 36–39.

Kuliev A., Rechinsky S., Cieslak J., Verlinsky Y.P. Preimplantation diagnosis as part of pre-pregnancy genetic screening / In: «Early Prenatal Diagnosis, Fetal Cells and DNA in the Mother. Present State and Perspectives». M.Macek, D.Bianchi, H.Cuckle (Eds). – Prague: The Carolinum. Press, 2002. – P. 267–272.

Kuliev A.M., Modell B., Jackson L. et al. Risk evaluation of CVS // *Prenatal Diagn.* – 1993. – Vol. 13. – P. 197–209.

Kullander S., Sandahl B. Fetal chromosome analysis after transcervical placental biopsies during early pregnancy // *Obstet. Gynecol. Scand.* – 1973. – Vol. 52. – P. 355–359.

Kurilo L.F. Oogenesis in antenatal development in man // *Hum. Genet.* – 1981. – Vol. 57. – P. 86–92.

Kuznetzova T., Kiseleva N., Shlykova Sv. et al. Prenatal diagnosis of chromosomal disorders in North-West Russia // *BJMG.* – 1998. – Vol. 1. – №1. – P. 21–28.

Laigaard J. Sorensen T., Frohlich K. et al. ADAM 12 – a novel first trimester maternal serum marker for Down's syndrome // *Prenat. Diagn.* – 2003. – Vol. 23. – P. 1086–1091.

Lakich D., Kazazian HH Jr., Antonarakis S.E., Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A // *Nat. Genet.* – 1993, Nov. – Vol. 5 (Suppl. 3). – P. 236–241.

Lam Y.H., Yeung W.S.B., Tang M.H.Y. et al. Maternal serum alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in pregnancies conceived after intracytoplasmic sperm injection and conventional in vitro fertilization // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14. – №8. – P. 2120–2123.

Lambert-Messerlian G.M., Canick J.A. Placenta growth factor level in second trimester maternal serum in Down syndrome pregnancy and in the prediction of preeclampsia // *PD.* – 2004. – Vol. 24. – №11. – P. 876–880.

Lambert-Messerlian G.M., Silver H.M., Petraglia F. et al. Second-trimester levels of maternal serum human chorionic gonadotropin and inhibin A as predictors of preeclampsia in the third trimester of pregnancy // *J. Soc. Gynecol. Investig.* – 2000. – Vol. 7. – №3. – P. 170–174.

Lambl D. Ein seltener fall von hydramnios // *Zentrablatt für gynakologie.* – 1881. – Bd. 5. – S. 329–334.

Laphorn A.J., Hariris D.C., Littlejohn A. et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin // *Nature.* – 1994. – Vol. 369. – №9. – P. 455–461.

Larson J.E. Morrow S.L., Delcarpio J.B. et al. Gene transfer into the fetal primate: evidence for the secretion of transgene product // *Mol. Therapy.* – 2000. – Vol. 2. – №6. – P. 631–639.

Larose C., Massoc P., Hillion Y. et al. Comparison of fetal nasal bone assessment by ultrasound at 11–14 weeks and by postmortem X-ray in trisomy 21: a prospective observational study // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2003. – Vol. 22. – P. 27–30.

Ledbetter D.H., Engel E. Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis // *Hum. Mol. Genet.* – 1995. – Vol. 5. – Spec. – P. 1757–1764.

Leschot N.J., Schuring-Blom G.H., Van Prooijen-Knegt A.C. et al. The outcome of pregnancies with confined placental mosaicism in cytotrophoblast cells // *Prenat Diagn.* – 1996. – Vol. 16. – №8. – P. 705–712.

Lestou V.S., Kalousek D.K. Confined placental mosaicism and intrauterine fetal growth // *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed.* – 1998. – Vol. 79. – P. F223–F226.

Liechr T., Nietzel A., Weise A. et al. A strategy for the characterization of small supernumerary marker chromosomes (SMC) // *BJMG.* – 2003. – Vol. 6. – №3&4 (Suppl.). – P. 69–72.

Liley A.W. Liquor amnii analysis in management of pregnancy complicated by rhesus sensitization // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1961. – Vol. 82. – P. 1359–1370.

Liu S., Lee F., Lee J. et al. Pregnancy outcomes in unselected singleton pregnant women with an increased risk of first-trimester Down's syndrome // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* – 2004. – Vol. 83. – P. 1130–1134.

Lo Y.M.D. Bidirectional plasma DNA trafficking between mother and fetus / In: «Early Prenatal Diagnosis, Fetal Cells and DNA in the Mother. Present State and Perspectives». M. Macek, D. Bianchi, H. Cuckle (Eds). – Prague: The Carolinum. Press, 2002. – P. 144–153.

Lo Y.M.D., Magnus M., Path F.R.C. et al. Prenatal Diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma // *New Engl. J. Med.* – 1998. – Vol. 339 (Suppl. 24). – P. 1734–1738.

Longo D., Defigueiredo D., Cicero S. et al. Femur and humerus length in trisomy 21 fetuses at 11–14 weeks of gestation // *Ultrasound Obstet Gynecol.* – 2004. – Vol. 23. – P. 143–147.

Ludomirsky A., Nemiroff R., Jonson A. et al. Percutaneous umbilical blood sampling. A new technique for prenatal diagnosis // *J. Reprod. Med.* – 1987. – Vol. 32. – №12. – P. 276–279.

Ludomirsky A., Weiner S., Ashmead G.G. et al. Percutaneous fetal umbilical blood sampling: Procedure safety and normal fetal hematologic indices // *Am. J. Perinatol.* – 1988. – Vol. 5. – P. 264.

Lyndon M.H. Invasive ultrasound principles (OB / GYN) / In: «Diagnostic ultrasound». J.P.McCrahan, B.B.Goldberg (Eds). – Philadelphia, 1997. – P. 77–106.

Macek M., Bianchi D., Cuckle H. (eds). Early Prenatal Diagnosis, Fetal Cells and DNA in the Mother. Present State and Perspectives. – Prague: The Carolinum Press, 2002. – 426 p.

Madan K., Seabright M., Lindenbaum R.H., Bobrow M. Paracentric inversion in men // *J. Med. Genet.* – 1984. – Vol. 21. – №6. – P. 407–412.

Magee A., Nevin N., Armstrong M. Ullrich–Turner syndrome: seven pregnancies in an apparent 45, X woman // *Am. J. Med. Gen.* – 1998. – Vol. 75. – №1. – P. 1–3.

Malbohan I., Fialova L., Mikulikova L. et al. Use of fetoplacental antigens in prenatal diagnosis // *Cesk. Gynecol.* – 1992. – Vol. 57. – №2. – P. 59–64.

Masseyeff R., Gilli J., Krebs B. et al. Evolution of alpha-fetoprotein serum levels throughout life in humans and rats and during pregnancy in the rat // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1975. – Vol. 259. – P. 17–28.

Matias A., Huggon I., Areias J.C. et al. Cardiac defects in chromosomally normal fetuses with abnormal ductus venosus blood flow at 10–14 weeks // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 1999. – Vol. 14. – P. 307–310.

Matias A., Montenegro N., Areias J.C., Brandao O. Anomalous fetal venous return associated with major chromosomopathies in late first trimester of pregnancy // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 1998. – Vol. 11. – P. 209–213.

Maxwell D.J., Johnson P., Hurley P. et al. Fetal blood sampling and pregnancy loss in relation to indication // *Br. J. Obstet. Gynecol.* – 1991. – Vol. 98. – P. 892.

McKusick V.A. Genomics: structural and functional studies of genomes // *Genomics.* – 1997. – Vol. 15. – №45 (Suppl. 2). – P. 244–249.

McNeil S.M., Novelletto A., Srinidhi J. et al. Reduced penetrance of the Huntington's disease mutation // *Hum. Mol. Genet.* – 1997. – Vol. 6. – P. 775–779.

Merkatz I.R., Nitowsky H.M., Macri J.M., Johnson W.E. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal anomalies // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1984. – Vol. 148. – P. 886–891.

Metaxotani A., Antsaklis P., Panagioutopoulou P. et al. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities from chorionic biopsy samples: improved success rate using a modified direct method // *Prenat. Diagn.* – 1987. – Vol. 7. – №9. – P. 461–470.

Metzenbauer M., Hafner E., Schuchter K., Philipp K. First-trimester placental volume as a marker for chromosomal anomalies: preliminary results from an unselected population // *Ultrasound Obstet Gynecol.* – 2002. – Vol. 19. – P. 240–242.

Minderer S., Gloning K.P., Henrich W., Stoger H. The nasal bone in fetuses with trisomy 21: sonographic versus pathomorphological findings // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2003. – Vol. 22 (Suppl. 1). – P. 16–21.

- Mirre C., Hartung M., Stahl A.* Association of ribosomal genes in the fibrillar center of the nucleolus: a factor influencing translocation and nondisjunction in the human meiotic oocyte // *PNAS*. – 1980. – Vol. 77. – №10. – P. 6017–6021.
- Mohr J.* Fetal genetics diagnosis: development of techniques for early sampling of fetal cells // *Acta Patholog. Microbiolog. Scand.* – 1968. – Vol. 73. – P. 73–77.
- Morel Y., Miller W.L.* Clinical and molecular genetics of Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // *Adv. Hum. Genet.* – 1991. – Vol. 20. – P. 1–68.
- Muller F., Dreux S., Oury J.F. et al.* Down syndrome maternal serum marker screening after 18 weeks' gestation // *Prenat. Diagn.* – 2002. – Vol. 22 (Suppl. 11). – P. 1001–1004.
- Muller M.A., Hecher K., Pajkrt E., Bilardo C.M.* Ductus venosus studies in fetuses with enlarged nuchal translucency: necessity or luxury? / 9th World Congress of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. – Buenos Aires, November 14–18, 1999. – P. 50.
- Murthy K.D.S., Farag T.I.* Recurrent regular trisomy 21 in two bedouin families. Parental mosaicism versus genetic predisposition // *Ann. Genet.* – 1995. – Vol. 38. – №4. – P. 217–224.
- Nadel A.S., Green J.K., Holmes L.B. et al.* Absence of need for amniocentesis in patient with elevated levels of maternal serum alpha-fetoprotein and normal ultrasonographic examinations // *New Engl. J. Med.* – 1990. – Vol. 323. – P. 557–561.
- Nadler H.* Antenatal detection of hereditary disorders // *Pediatrics.* – 1968. – Vol. 42. – P. 912–918.
- Nadler H.L.* Patterns of enzyme development utilizing cultivated human fetal cells derived from amniotic fluid // *Biochem. Genet.* – 1968. – Vol. 2. – P. 119–126.
- Navarro J., Benet J., Martorell M.R. et al.* Segregation analysis in a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 7 (p13;q36) by sperm chromosome studies // *Am. J. Hum. Genet.* – 1993. – Vol. 53. – №1. – P. 214–219.
- Neveux L.M., Palomaki G.E., Knight G.J., Haddow J.E.* Multiple marker screening for Down syndrome in twin pregnancies // *Prenat. Diagn.* – 1996. – Vol. 16. – P. 1115–1119.
- Newby D., Aitken D.A., Crossley J.A. et al.* Biochemical markers of trisomy 21 and the pathophysiology of Down's pregnancies // *Prenat. Diagn.* – 1997. – Vol. 17. – №10. – P. 941–951.
- Newby D., Aitken D. A., Howatson A.G., Connor J.M.* Placental synthesis of oestriol in Down's syndrome pregnancies // *Placenta.* – 2000. – Vol. 21. – №2–3. – P. 263–267.
- Newby D., Dalgliesh G., Lyall F., Aitken D.A.* Alpha-fetoprotein and alpha-fetoprotein receptor expression in the normal human placenta at term // *Placenta.* – 2005. – Vol. 26. – №2–3. – P. 190–200.
- Niazi M., Coleman D.V., Loeffler F.E.* Trophoblast sampling in early pregnancy. Culture of rapidly dividing cells from immature placental villi // *Brit. J. Obstet. Gynecol.* – 1981. – Vol. 88. – №11. – P. 1081–1085.
- Nicolaides K.H., Brizot M.L., Patel F., Snijders R.J.M.* Comparison of chorion villus sampling and early amniocentesis for karyotyping in 1492 singleton pregnancies // *Fetal. Diagn. Ther.* – 1996. – Vol. 11. – P. 9–15.
- Nicolaides K.H., Spencer K., Avdigou K. et al.* Multicenter study of first trimester screening for trisomy 21 in 75821 pregnancies: results and estimation of potential impact of individual risk-oriented two-stage first trimester screening // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2005. – Vol. 25. – №3. – P. 221–226.

Nicolaides K.N., Azar G., Byrne D. et al. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy // *BMJ*. – 1992. – Vol. 304. – P. 867–889.

Nicolaides K.N., Brizot M.L., Snijders R.J.M. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for fetal trisomy in the first trimester of pregnancy // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* – 1994. – Vol. 101. – P. 782–786.

Nicolaides K.N., Sebire N.J., Snijders R., Johnson S. Down's syndrome screening in the UK // *The Lancet*. – 1996. – Vol. 347. – P. 906–907.

Nicolaides K.N., Sebire N.J., Snijders R.J.M. The 11–14 weeks scan. The diagnosis of fetal abnormalities. – New York, London: The Parthenon Publishing Group, 1999. – P. 196.

Niemimaa M., Suonpaa M., Perheentupa A. et al. Evaluation of first trimester maternal serum and ultrasound screening for Down's syndrome in Eastern and Northern Finland // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2001. – Vol. 9. – P. 404–408.

Norgaard-Pedersen B., Moller J., Trolle D., Sorensen A. Alpha-fetoprotein concentration in cord blood from twins and from a set of quadruplets – a case of superfetatio? // *Hum. Hered.* – 1976. – Vol. 26. – P. 72–80.

Novak A., Kokai G., Popovic V. et al. Interphase cytogenetics on paraffin-embedded sections of ovary for detection of genomic constitution in a patient with Turner's syndrome and chromosomal mosaicism // *Hum. Gen.* – 1995. – Vol. 95. – №3. – P. 293–298.

Oberweis D., Gillerot Y., Koulischer K. et al. Le placenta des trisomie dans le dernier trimestre de la gestation // *J. Gynecol. Obstetr. Biol. Reprod.* – 1983. – Vol. 12. – P. 345–349.

Odur G., Gull D., Ozen S. et al. Application of «APT TEST» in prenatal diagnosis to evaluate the fetal origin of blood obtained by «chordocentesis». Results of 30 pregnancies // *Eur. J. Hum. Genet.* – 1996. – Vol. 4. – №1. – P. 155.

Omtzigt J.G.C., Lindhond D. Valproate use during pregnancy and spina bifida aperta // *Hum. and Exp. Toxicol.* – 1993. – Vol. 12 (Suppl.1). – P. 70–71.

Ong C.Y., Liao A.W., Munim S. et al. First trimester maternal serum activin A in pre-eclampsia and fetal growth restriction // *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* – 2004. – Vol. 15. – №3. – P. 176–180.

Orlandi F., Bilardo C.M., Campogrande M. et al. Measurement of nasal bone length at 11–14 weeks of pregnancy and its potential role in Down syndrome risk assessment // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2003. – Vol. 22. – P. 36–39.

Orlandi F., Damiani G., Jakil C. et al. The risk of early cordocentesis (12–21 weeks): Analysis of 500 procedures // *Prenat. Diagn.* – 1990. – Vol. 10. – P. 425.

Ostensen M., Ostensen H. Safety of nonsteroidal antiinflammatory drugs in pregnant patients with rheumatic disease // *J. of Rheumatology*. – 1996. – Vol. 26 (Suppl. 6). – P. 1045–1049.

Otano L., Aiello H., Igarzabal L. et al. Association between first trimester absence of fetal nasal bone on ultrasound and Down syndrome // *Prenat. Diagn.* – 2002. – Vol. 22. – P. 930–932.

Ozturk M., Milunsky A., Brambati B. et al. Abnormal maternal level of hCG subunits in trisomy 18 // *Am. J. Med. Genet.* – 1990. – Vol. 36. – P. 480–483.

Palomaki G.E., Knight G.J., Haddow J.E. et al. Cigarette smoking and levels of maternal serum alpha-fetoprotein, unconjugated estriol, and hCG: impact on Down syndrome screening // *Obstetr. Gynecol.* – 1993. – Vol. 81. – P. 675–678.

Palomaki G.E., Neveux L.M. Using multiples of the median to normalize serum protein measurements // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2001, Nov. – Vol. 39 (Suppl. 11). – P. 1137–1145.

Papp Z. Obstetric genetics. – Budapest: Akademia Klado, 1990. – P. 126–190 (627 p.).

Peled Y., Gilboa Y., Perri T. et al. Strict glycemic control in diabetic pregnancy – implications for second trimester screening for Down syndrome // *Prenat. Diagn.* – 2003. – Vol. 23. – №11. – P. 888–890.

Penso C.A., Sandstrom M.M., Garber M.F. et al. Early amniocentesis: report of 407 cases with neonatal follow-up // *Obstet. Gynecol.* – 1990. – Vol. 76. – P. 1032–1036.

Pepe G.J., Albrecht E.D. Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy // *Endocrin. Rev.* – 1995. – Vol. 16. – №5. – P. 608–648.

Petraglia F., Garuti G.C., Calza L. et al. Inhibin subunits in human placenta: localization and messenger ribonucleic acid levels during pregnancy // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1991. – Vol. 165. – P. 750–758.

Phillips O.P., Tharapel A.T., Lerner J.L. et al. Risk of fetal mosaicism when placental mosaicism is diagnosed by chorionic villus sampling // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1996. – Vol. 174. – №3. – P. 850–855.

Prochownik L. Beitrage zur lehre vom fruchtwasser und seiner entstellung // *Archives Gynecology.* – 1877. – Vol. 11. – P. 305–345.

Proposed international guidelines on ethical issues in medical genetics and genetic services. Report of WHO Meeting on Ethical Issues in Medical Genetics. World Health Organization. Human genetics programme. – 1998. – 15 p.

Qin Q.P., Kakkala S., Lund J. et al. Molecular distinction of circulating pregnancy-associated plasma protein A in myocardial infarction and pregnancy // *Clin. Chem.* – 2005. – Vol. 51 (Suppl. 1). – P. 75–83.

Qu J., Thomas K. Inhibin and activin production in human placenta // *Endocr. Rev.* – 1995. – Vol. 16. – №4. – P. 485–507.

Qu J., Thomas K. Regulation of inhibin secretion in human placental cell culture by epidermal growth factor, transforming growth factors and activin // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1993. – Vol. 77. – P. 925–931.

Rahim R.R., Cuckle H.S., Sehmi I.K., Jones R.G. Compromise ultrasound dating policy in maternal serum screening for Down syndrome // *Prenat. Diagn.* – 2002. – Vol. 22. – №13. – P. 1181–1184.

Raio L., Ghezzi F., Cromi A. et al. Sonographic morphology and hyaluronan content of umbilical cords of healthy and Down syndrome fetuses in early gestation // *Early Hum. Dev.* – 2004. – Vol. 77. – P. 1–12.

Ralph A., Scott F., Tiernan C. et al. Maternal uniparental isodisomy for chromosome 14 detected prenatally // *Prenat. Diagn.* – 1999. – Vol. 19. – №7. – P. 681–684.

Rampersaud G.C., Kauwell G.P., Bailey L.B. Folate: a key to optimizing health and reducing disease risk the elderly // *J. Am. Coll. Nutr.* – 2003. – Vol. 22 (Suppl. 1). – P. 1–8.

Ramsey P.A., Fisk N.M. Amniocentesis / In: «High risk pregnancy». D.K.James, P.J.Steer, C.P.Weiner, B.Gonik (Eds). – London, 1996. – P. 735–744.

Raymond G., Harley E.A., Holmes L.B. Valproate teratogenicity: data from the maternal epilepsy study // *Teratology.* – 1993. – Vol. 47 (Suppl. 5). – P. 383.

Rhoads G.G., Jackson I.G., Schlesselman S.E. et al. The safety and efficacy of chorionic villus sampling for early prenatal diagnosis of cytogenetic abnormalities // *N. Engl. J. Med.* – 1989. – Vol. 320. – P. 609–619.

Riordan J.M., Rommens J.M., Kerem B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA // *Science*. – 1989. – Vol. 245. – P. 1066–1073.

Rizzo G., Capponi A., Rinaldo D. et al. Release of vasoactive agents during cordocentesis: differences between normal grown and grown-retarded fetuses // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1996. – Vol. 175. – P. 563–570.

Roberts E., Duckett D., Lang G. Maternal cell contamination in chorion villus samples assessed by direct preparations and three different culture methods // *Prenat. Diagn.* – 1988. – Vol. 8. – №9. – P. 635–640.

Roberts L.J., Bewley S., Mackinson A.M., Rodek C.H. First trimester fetal nuchal translucency: problems with screening the general population // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* – 1995. – Vol. 2. – P. 381–385.

Robertson D.M., Foulds L.M., Leversha L. et al. Isolation of inhibin from bovine follicular fluid // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1985. – Vol. 126. – P. 220–226.

Robinson W.P., McFaddem D.E., Stephenson M.D. The origin of abnormalities in recurrent aneuploidy / poliploidy // *Am. J. Hum. Genet.* – 2001. – Vol. 69. – №6. – P. 1245–1254.

Rode L., Wojdemann K.R., Shalmi A.C. et al. Combined first- and second-trimester screening for Down syndrome: an evaluation of proMBP as a marker // *Prenat. Diagn.* – 2003. – Vol. 23. – №7. – P. 593–598.

Rodek C.H., Campbell S. Sampling pure fetal blood by fetoscopy in second trimester of pregnancy // *Br. Med. J.* – 1978. – Vol. 2. – P. 728–730.

Rogan P.K., Sabol D.W., Punnett H.H. Maternal uniparental disomy of chromosome 21 in a normal child // *Am. J. Med. Genet.* – 1999. – Vol. 83. – №1. – P. 69–71.

Roland B., Lynch L., Berkowitz G., Zinberg R. Confined placental mosaicism in CVS and pregnancy outcome // *Prenat. Diagn.* – 1994. – Vol. 14. – №7. – P. 589–593.

Rolland A. Gene Medicine: The end of the beginning? // *Advanced drug delivery Reviews*. – 2005. – Vol. 57. – P. 669–673.

Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B. et al. Identification of Cystic Fibrosis gene: Chromosome walking & jumping // *Science*. – 1989. – Vol. 245. – P. 1059–1065.

Rote N.S. Pathophysiology of Rh isoimmunisation // *Clin. Obstet. Gynecol.* – 1982. – Vol. 25. – P. 243–253.

Rotmensch S., Celentano C., Shalev J. et al. Midtrimester maternal serum screening after multifetal pregnancy reduction in pregnancies conceived by in vitro fertilization // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 1999. – Vol. 16. – №1. – P. 8–12.

Ruoslahti E., Seppala M. Alpha-fetoprotein in normal human serum // *Nature*. – 1972. – Vol. 235. – P. 161–162.

Rustico M.A., Bussani R., Silvestri F. Nasal bone and trisomy 21: prenatal ultrasound and postmortem morphohistological study // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2004. – Vol. 23. – P. 96–97.

Saks E., McCoy M.C., Damron J., Kelly T.E. Confined placental mosaicism for trisomy 8 and intra-uterine growth retardation // *Prenat. Diagn.* – 1998. – Vol. 18. – №11. – P. 1202–1204.

Saltvedt S., Almstrom H., Kublickas M. et al. Ultrasound dating at 12–14 or 15–20 weeks of gestation? A prospective cross-validation of established dating formulae in a population of in-vitro fertilized pregnancies randomized to early or late dating scan // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2004. – Vol. 24. – №1. – P. 42–50.

Schuchter K., Hafner E., Stangl G. et al. The first trimester «combined test» for the detection of Down's syndrome pregnancies in 4939 unselected pregnancies // *Prenat. Diagn.* – 2002. – Vol. 22. – P. 211–215.

Schuchter K., Wald N.J., Hackshaw A.K. et al. The distribution of nuchal translucency at 10–13 weeks of pregnancy // *Prenat. Diagn.* – 1998. – Vol. 5. – P. 103–106.

Schwinger E. Present state and possibilities for the further development of preimplantation and preimplantation genetic diagnosis in Germany / In: «Early Prenatal Diagnosis, Fetal Cells and DNA in the Mother. Present State and Perspectives». M.Macek, D.Bianchi, H.Cuckle (Eds). – Prague: The Carolinum. Press, 2002. – P. 228–230.

Seed A.E. Current concepts of amniotic fluid dynamics // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1980. – Vol. 138. – P. 575–586.

Seer D.M., Margolis E. Diagnosis of fetal sex in a sex linked hereditary disorders // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1964. – Vol. 88. – P. 230–232.

Sekizawa A., Farina A., Koide K. et al. Beta-globin DNA in maternal plasma as a molecular marker of pre-eclampsia // *Prenat. Diagn.* – 2004. – Vol. 24. – №9. – P. 697–700.

Shepard Th.H. Catalog of teratogenic agents. 9th edition. – Baltimore, London: The Johns-Hopkins Univ. Press, 1998. – 593 p.

Shi Z., Xu W., Loechel F. et al. ADAM 12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3 // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 18574–18580.

Simoni G., Brambati B., Danesino C. et al. Efficient direct chromosome analysis and enzyme determinations from chorionic villi sampling in the first trimester of pregnancy // *Hum. Genet.* – 1983. – Vol. 63. – №4. – P. 349–357.

Simoni G., Sirchia S.M. Confined placental mosaicism // *Prenat. Diagn.* – 1994. – Vol. 14. – №13. – P. 1185–1189.

Simoni G., Tetzoli G., Romotti L. Fetal karyotyping by direct chromosome preparation // *Chorion villi sampling.* – N.Y. Basel: Marcel Dekker Inc., 1986. – P. 99–118.

Solari A.J. Synaptonemal complex analysis in human male infertility // *Eur. J. Histochem.* – 1999. – Vol. 43. – №4. – P. 265–276.

Sonek J.D., McKenna D., Webb D. et al. Nasal bone length throughout the gestation: normal ranges based on 3537 fetal ultrasound measurements // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2003. – Vol. 21. – P. 152–155.

Soothill P.W. Fetal blood sampling before labor / In: «High risk pregnancy». D.K.James, P.J.Steer, C.P.Weiner, B.Gonik (Eds). – London, 1996. – P. 735–744.

Spencer K., Bindra R., Nicolaidis K.H. Maternal weight correction of maternal serum PAPP-A and free beta-hCG MoM when screening for trisomy 21 in the first trimester of pregnancy // *Prenat. Diagn.* – 2003a, Oct. – Vol. 23 (Suppl. 10). – P. 851–855.

Spencer K., Nicolaidis K.H. A first trimester trisomy 13 / trisomy 18 risk algorithm combining fetal nuchal translucency thickness, maternal serum free beta-hCG and PAPP-A // *Prenat. Diagn.* – 2002a, Oct. – Vol. 22 (Suppl. 10). – P. 877–879.

Spencer K. Between pregnancy biological variability of first trimester markers of Down syndrome and the implications for screening in subsequent pregnancies: an issue revisited // *Prenat. Diagn.* – 2002b, Oct. – Vol. 22 (Suppl. 10). – P. 874–876.

Spencer K., Bindra R., Cacho A.M., Nicolaidis K.H. The impact of correcting for smoking status when screening for chromosomal anomalies using maternal serum

biochemistry and fetal nuchal translucency thickness in the first trimester of pregnancy // *Prenat. Diagn.* — 2004. — Vol. 24. — №3. — P. 169–173.

Spencer K., Macri J.N., Aitken D.A., Connor J.M. Free beta-hCG as first trimester marker for fetal trisomy // *Lancet.* — 1991. — Vol. 339. — P. 1480.

Spencer K., Spencer C.E., Power M. et al. Screening for chromosomal abnormalities in the first trimester using ultrasound and maternal serum biochemistry in the one-stop clinic: a review of three years prospective experience // *BJOG.* — 2003b. — Vol. 110. — №3. — P. 281–286.

Stiggs E.L., Rademaker A.W., Martin R.T. Aneuploidy in human sperm: use of multicolor FISH to test various theories of nondisjunction // *Am. J. Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 58. — №2. — P. 356–362.

Statham H., Green J. Serum screening for Down's syndrome: some women's experiences // *Br. Med. J.* — 1993. — Vol. 307. — P. 174.

Steele M.W., Breg W.R. Chromosome analysis of human amniotic fluid cells // *Lancet.* — 1966. — Vol. 1. — №7434. — P. 383–385.

Stipoljev F., Latin V., Kos M. et al. Correlation of confined placental mosaicism with fetal intrauterine growth retardation. A case-control study of placentas at delivery // *Fetal. Diagn. Ther.* — 2001. — Vol. 16. — №1. — P. 4–9.

Stranc L.C., Evans J.A., Hamerton J.L. Prenatal diagnosis in Canada — 1990: a review // *Prenat. Diagn.* — 1994. — Vol. 14. — №13. — P. 1253–1265.

Szabo J., Gellen J. Nuchal fluid accumulation in trisomy 21 detected by vaginononography in first trimester // *The Lancet.* — 1990. — Vol. 2. — P. 1133.

Szabo J., Gellen J., Szemere G. First-trimester ultrasound screening for fetal aneuploidies in women over 35 and under 35 years of age // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* — 1995. — Vol. 5. — P. 161–163.

Tabor A., Larsen S.O., Neilsen S.O. et al. Screening for Down's syndrome using a iso-risk curve based on maternal age and serum alpha-fetoprotein level // *Br. J. Obstet. Gynaecol.* — 1987. — Vol. 94. — P. 636–642.

Taga M., Minaguchi H., Saotome K. Two pregnancies in 45, X / 46, X, r(X) / 46, XX Turner mosaic patient. A case report // *Gynecol. Obstet. Invest.* — 1996. — Vol. 42. — №3. — P. 206–208.

Tedde G., Tedde P. Mitotic index of the Langhans cells in the normal human placenta from the early stages of pregnancy to the term // *Acta anat.* — 1978. — Vol. 100. — №1. — P. 114–119.

Tetzoli G.I., Lalatta F., Gilbert F. Chorionic villi sampling: improved method for preparation of karyotypes after short term incubation // *Prenat. Diagn.* — 1987. — Vol. 7. — №6. — P. 389–394.

Touraine J.L. Perinatal fetal — cell and gene therapy // *Int. J. Immunopharmacology.* — 2000. — Vol. 22. — P. 1033–1040.

Trzepizur K., Hubner H., Trzepizur Z. A survey of satellite association formation by acrocentric chromosomes depending on their Ag-NOR class // *J. Appl. Genet.* — 1995. — Vol. 36. — №1. — P. 69–80.

Tsai M.S., Lee F.K., Cheng C.C. et al. Association between fetal nuchal translucency thickness in first trimester and subsequent gestational hypertension and preeclampsia // *Prenat. Diagn.* — 2002. — Vol. 22. — P. 747–751.

Uehara S., Nata M., Obara Y. et al. A Turner syndrome woman with a ring X chromosome whose child also had a ring X chromosome // *Fertil. Steril.* — 1997. — Vol. 67. — №3. — P. 576–579.

UK collaborative study on alpha-fetoprotein in relation of neural tube defects. Maternal serum alpha-fetoprotein measurement in antenatal screening of anen-

cephaly and spina bifida in early pregnancy // *Lancet*. – 1977. – Vol. 2. – P. 1323–1332.

UK collaborative study on alpha-fetoprotein in relation on neural tube defects: amniotic fluid alpha-fetoprotein measurements in antenatal diagnosis of anencephaly and open spina bifida in early pregnancy. Second report // *Lancet*. – 1979. – Vol. 2. – P. 651–661.

Vekmans M.J.J., Perry T.B. Cytogenetic analysis of chorionic villi: a technical assessment // *Hum. Genet.* – 1986. – Vol. 72. – №4. – P. 307–310.

Velissariou V. Uniparental disomy (UPD): a consequence of non-disjunction and the implications in prenatal diagnosis // *BJMG*. – 2003. – Vol. 6. – №3&4 (Suppl.). – P. 55–59.

Verkerk A.J.M.H., Pieretti M., Sutcliffe J. S. et al. Identification of a gene (FMR–1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome // *Cell*. – 1991. – Vol. 65. – P. 905–914.

Verlinsky Y., Kuliev A. (eds) Preimplantation diagnosis of genetic diseases // *New Technique in assisted reproduction*. – NY: Wiley-Liss, 1993. – 155 p.

Verlinsky Y., Kuliev A.M. (eds). An atlas of preimplantation genetic diagnosis. – NY, London: Parthenon Publishing Group, 2000. – 174 p.

Verlinsky Y., Rechiitsky S., Schoolcraft W. et al. Preimplantation diagnosis for Fankoni anemia combined with HLA matching // *JAMA*. – 2001. – Vol. 285. – №24. – P. 3130–3133.

Verma R.S., Babu A. Human Chromosomes: Manual of Basic Techniques. – NY: Pergamon Press. Inc., 1989. – 240 p.

Vermeesch J.R., Debiec-Rychter M., Melotte C. et al. Molecular karyotyping: towards improved pre- and postnatal diagnosis // *Europ. Cytogenet. Assoc.* – 2005. – №15. – P. 9–15.

Viora E., Masturzo B., Errante G. et al. Ultrasound evaluation of fetal nasal bone at 11 to 14 weeks in a consecutive series of 1906 fetuses // *Prenat. Diagn.* – 2003. – Vol. 23. – P. 784–787.

Vorsanova S.C., Kirilova E.A., Yurov Y.B. Chromosome abnormalities in spontaneous abortion: application of multicolor fluorescence hybridization and original DNA probes for chromosomes 1, 9, 13, 14, 16, 21, 22, X and Y // *BJMG*. – 2003. – Vol. 6. – №3–4. – P. 49–54.

Waddington S.N., Kamer M.G., Hernandez-Alcoceba R. et al. In utero gene therapy: current challenges and perspectives // *Molec. Therapy*. – 2005. – Vol. 11. – №5. – P. 662–676.

Wald N.J., Cuckle H.S., Densem J.W. et al. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy // *Br. Med. J.* – 1988a. – Vol. 279. – P. 883–887.

Wald N.J., Cuckle H.S., Densem J.W. et al. Maternal serum screening for Down's syndrome: the effect of routine ultrasound scan determination of gestational age and adjustment for maternal weight // *Br. J. Obstetr. Gynaecol.* – 1992b. – Vol. 99. – №2. – P. 144–149.

Wald N.J., Cuckle H.S., Densem J.W. et al. Maternal serum unconjugated oestriol as an antenatal screening test for Down's syndrome // *Br. J. Obstetr. Gynaecol.* – 1988b. – Vol. 95. – P. 334–341.

Wald N.J., Hackshaw A.K. Combining ultrasound and biochemistry in first trimester screening for Down's syndrome // *Prenat. Diagn.* – 1997b. – Vol. 17. – P. 821–829.

- Wald N.J., Hackshaw A.K., George L.M. Assay precision of serum alpha-fetoprotein in antenatal screening for neural tube defects and Down's syndrome // J. Med. Screen. — 2000. — Vol. 7. — P. 74–77.
- Wald N.J., Kennard A., Densem J.W. et al. Antenatal maternal serum screening test for Down's syndrome: result of demonstration project // Br. Med. J. — 1992a. — Vol. 305. — P. 391–394.
- Wald N.J., Kennard A., Hackshaw A. et al. Antenatal screening for Down's syndrome // J. Med. Screen. — 1997a. — Vol. 4. — P. 181–246.
- Wald N.J., Rish S., Hackshaw A.K. Combining nuchal translucency and serum markers in prenatal screening for Down's syndrome in twin pregnancies // Prenat. Diagn. — 2003. — Vol. 23. — №7. — P. 588–592.
- Wald N.J., Watt H.C., Hackshaw A.K. Integrated screening for Down's syndrome based on tests performing during the first and second trimester // N. Engl. J. Med. — 1999a. — Vol. 341. — P. 461–467.
- Wald N.J., Kennard A., Hackshaw A., McGuire A. Antenatal screening for Down's syndrome // Health Technol. Assessment. — 1998. — Vol. 2 (Suppl. 1). — P. 1–122.
- Wald N.J., Watt H.C., Norgaard-Pedersen B., Christiansen M. SP1 in pregnancies with Down syndrome in the first trimester of pregnancy // International Prenatal Screening Research Group. Prenat. Diagn. — 1999b. — Vol. 19 (Suppl. 6). — P. 517–520.
- Walter C.A., Shaffer L.G., Kaye C.I. et al. Short-limb dwarfism and hypertrophic cardiomyopathy in a patient with paternal isodisomy 14: 45, XY, idic (14) (p11) // Am. J. Med. Genet. — 1996. — Vol. 65. — №4. — P. 259–265.
- Wapner R.J., Simpson J.L., Golbus M.S. et al. Chorionic mosaicism: association with fetal loss but not with adverse perinatal outcome // Prenat. Diagn. — 1992. — Vol. 12. — №5. — P. 347–355.
- Ward R.H.T., Model B., Petrou M. et al. Method of sampling chorionic villi in first trimester of pregnancy under guidance of real time ultrasound // Brit. Med. J. — 1983. — Vol. 286. — P. 1542–1544.
- Watt H.C., Wald N.J. Alternative methods of maternal weight adjustment in maternal serum screening for Down's syndrome and neural tube defects // Prenat. Diagn. — 1998. — Vol. 18. — №8. — P. 842–845.
- Webb A.L., Sturgiss S., Warwicker P. et al. Maternal uniparental disomy for chromosome 2 in association with confined placental mosaicism for trisomy 2 and severe intrauterine growth retardation // Prenat. Diagn. — 1996. — Vol. 16. — №10. — P. 958–962.
- Wegner R.D. Chorionic villi analysis // Advances in mutagenesis research—4. — Basel: Springer-Verlag, 1993. — P. 204–235.
- Weiner C.P. Fetal hemolytic disease / In: «High risk pregnancy». D.K. James, P.J. Steer, C.P. Weiner, B. Gonik (Eds). — London, 1996. — P. 783–801.
- Weiner C.P., Wenstrom K.D., Sipes S.L. et al. Risk factors for cordocentesis and fetal intravascular transfusion // Am. J. Obstet. Gynecol. — 1991. — Vol. 165. — P. 1020.
- White P.C., New M.I., Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1986. — Vol. 83. — P. 5111–5115.
- White P.C., Speiser P.W. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // The Endocrine society, USA. — 2002. — P. 245–291.
- WHO Scientific Group Principles for the testing of drugs for teratogenicity // Techn. Rep. Ser. 1967, 1998. — №364. — 37 p.

Wilkins-Haug L., Roberts D.J., Morton C.C. Confined placental mosaicism and intrauterine growth retardation: a case-control analysis of placentas at delivery // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1995. – Vol. 172. – №1. – Pt. 1. – P. 44–50.

Williams K.L., Nix B.A.J., Dunstan F.D.J. Effect of screening algorithm, parameter values and median smoothing on patient-specific risk estimates for Down's syndrome screening // *Ann. Clin. Chem.* – 2000. – Vol. 37. – P. 165–173.

Wilson J.G. Embryological considerations in teratology / In: «Teratology Principals & Techniques». – Chicago, London: Univ. Chicago Press, 1965. – P. 251–261.

Wojdemann K.R., Shalmi A.C., Christiansen M. et al. Improved first-trimester Down syndrome screening performance by lowering the false-positive rate: a prospective study of 9941 low-risk women // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2005, Mar. – Vol. 25 (Suppl. 3). – P. 227–233.

Wolstenholme J., Rooney D.E., Davison E.V. Confined placental mosaicism, IUGR, and adverse pregnancy outcome: a controlled retrospective U.K. collaborative survey // *Prenat. Diagn.* – 1994. – Vol. 14. – №5. – P. 345–361.

Wright D.E., Bradbury I. Repeated measures screening for Down's syndrome // *BJOG.* – 2005. – Vol. 112 (Suppl. 1). – P. 80–83.

Yamada K. Population studies of inv (9) chromosomes in 4, 300 Japanese: incidence, sex difference and clinical significance // *Jpn. J. Hum. Genet.* – 1992. – Vol. 37. – №4. – P. 293–301.

Yaron Y., Cherry M., Kramer R.L. et al. Second trimester maternal serum marker screening: maternal serum alpha-fetoprotein, beta-human chorionic gonadotropin, estriol, and their various combinations as predictors of pregnancy outcome // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1999. – Vol. 181. – №4. – P. 968–974.

Ying S. Inhibins, activins and follistatin: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone // *Endocrin. Rev.* – 1988. – Vol. 9. – P. 267–293.

Yoshizawa J., Li X.-K., Fujino M. et al. Successful in utero gene transfer using a gene gun in midgestational mouse fetuses // *J. Pediatr. Surgery.* – 2004. – Vol. 39. – №1. – P. 81–84.

Zoppi M.A., Ibba R.M., Axiana C. et al. Absence of fetal nasal bone and aneuploidies at first trimester nuchal translucency screening in unselected pregnancies // *Prenat. Diagn.* – 2003. – Vol. 23 (Suppl. 6). – P. 496–500.

ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ И ВРОЖДЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

*Под ред. акад. РАМН, проф. Э.К.Айламазяна,
чл.-корр., проф. В.С.Баранова*

Главный редактор: *В.Ю.Кульбакин*
Ответственный редактор: *Е.Г.Чернышова*
Редактор: *М.Н.Ланцман*
Корректоры: *Л.Ю.Шанина, О.А.Эктова*
Компьютерный набор и верстка: *Д.В.Давыдов, А.Ю.Кишканов*

ISBN 5-98322-345-3



9 785983 223455

Лицензия ИД №04317 от 20.04.01 г.
Подписано в печать 27.09.07. Формат 84×108/32.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Объем 13 п.л.
Гарнитура Таймс. Тираж 2000 экз. Заказ №2618

Издательство «МЕДпресс-информ».
119048, Москва, Комсомольский проспект, д. 42, стр. 3
Для корреспонденции: 105062, Москва, а/я 63
E-mail: office@med-press.ru
www.med-press.ru

Отпечатано с готовых диапозитивов
в ОАО «Типография «Новости»
105005, Москва, ул. Фр. Энгельса, 46