

На правах рукопису

ХРИСТИЧ
Алла Василівна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧНІ
ДОСЛІДЖЕННЯ ХРОМОСОМНИХ АНОМАЛІЙ
В ПОСТНАТАЛЬНІЙ І ПРЕНАТАЛЬНІЙ
ДІАГНОСТИЦІ ПРИ МЕДИЧНО-ГЕНЕТИЧНОМУ
КОНСУЛЬТУВАННІ**

03.00.15 — генетика

А в т о р е ф е р а т

дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Х а р к і в — 1994



Дисертація є рукописом.

Робота виконана у Харківському міжобласному медично-генетичному центрі і Московському науковому центрі психічного здоров'я РАМН.

Наукові керівники: доктор біологічних наук, доцент **Юров Юрій Борисович**; доктор медичних наук, професор, академік УЕАН **Гречаніна Олена Яківлівна**.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, **Атраментова Любов Олексіївна**; доктор медичних наук, професор **Бужиевська Тамара Іванівна**.

Провідна організація: Український науковий медично-генетичний центр (м. Київ).

Захист відбудеться « 2 . » *грудня* . 1994 р. о *15¹⁵* год. на засіданні спеціалізованої вченої ради К 053.06.07 Харківського державного університету (310077, м. Харків, майдан Свободи, 4, аудиторія 3-15).

З дисертацією можна ознайомитись в Центральній науковій бібліотеці ХДУ.

Автореферат розіслано « *24* . » *березня* . 1994 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук

Некрасова А. В. НЕКРАСОВА.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми: Хромосомні хвороби займають ведуче місце в спадковій патології людини. Серед причин загибелі ембріонів або плодів, а також багатьох вроджених вад і аномалій розвитку у новонароджених хромосомні аномалії належить одне з перших місць (Фогель Ф., Мотульські А., 1989; Ворсанова С.Г., 1991). До 50% всіх діагностованих спонтанних абортів обумовлені хромосомним дисбалансом, а в 10 з 1000 новонароджених дітей спостерігаються хромосомні зміни (Бочков Н.П. та ін., 1984; Ворсанова С.Г., Фров В.Б., 1987). Найбільш розповсюдженими є анеуплоїдії по хромосомам 13, 18, 21, X і Y, що супроводжуються важкими фенотипними проявами, які потребують їх ранньої пренатальної діагностики (Lubs H., Ruddle F., 1970; Jacobs P., 1977; Epstein C., 1986; Kuo W. et al, 1991) з метою елімінації для попередження дитячої смертності. Це пояснює необхідність вивчення методів ефективної діагностики хромосомної патології, як в постнатальній, так і в пренатальній періоди розвитку плода.

Одним з найбільш сучасних і перспективних напрямків в діагностиці хромосомних хвороб є метод гібридизації нуклеїнових кислот *in situ*, оснований на технології отримання рекомбінантних молекул ДНК і використанні їх у вигляді ДНК-зондів для діагностики хромосомної патології. Цей метод має важливу перевагу в порівнянні з іншими способами дослідження хромосомних аномалій в постнатальній і пренатальній діагностиці, так як він дозволяє аналізувати окремі хромосоми практично у всіх стадіях клітинного циклу, в тому числі на інте́рфазі (Cremer T. et al, 1986; Julien C. et al, 1986; Lichter P. et al, 1988; Pinkel D. et al, 1988; Ворсанова С.Г., Фров В.Б., 1991; Klinger K. et al, 1992).

Застосовуючи молекулярно-цитогенетичний метод (метод гібридизації нуклеїнових кислот *in situ*), можна більш точно і ефективно визначити особливості хромосомного набору людини і розв'язати ряд практичних завдань в області вивчення хромосомних порушень. Таким чином, розробка нових, вдосконалення попередніх методів діагностики хромосомної патології є актуальними проблемами сучасної медичної генетики.

МЕТА І ЗАВДАННЯ РОБОТИ. Основна мета роботи - вивчити ефективність комплексного цитогенетичного і молекулярно-цитогенетичного досліджень в постнатальній і пренатальній діагностиці хромосомних аномалій. Для досягнення вказаної мети були поставлені наступні завдання:

1. Оцінити потребу МГК в проведенні молекулярно-цитогенетичного аналізу на різних клітинах в постнатальній і пренатальній період.

2. Оптимізувати умови нерадіоактивної гібридизації *in situ* (FISH-флуоресцентної *in situ* гібридизації) для ідентифікації індивідуальних хромосом людини в метафазних і інтерфазних клітинах людини з використанням клонованих сателітних ДНК людини.

3. Оцінити можливість використання ДНК-зондів, специфічних для хромосом 13, 18, 21, X і Y людини при проведенні пренатальної і постнатальної діагностики за допомогою гібридизації нуклеїнових кислот *in situ*.

4. Застосувати дані клонованої послідовності для ідентифікації аберрантних хромосом при основних, соціально значущих формах хромосомних хвороб (трисомія 18, 21, аномалія гомосом, включаючи мозаїкові форми).

НАУКОВА НОВИЗНА РОБОТИ. Вперше оцінена достовірність нерадіоактивної гібридизації *in situ* для метафазного та інтер-

разного аналізу аномалій каріотипу у людини.

Вперше визначені умови використання цього нового, ефективного методу в постнатальній і пренатальній діагностиці хромосомних аномалій. Показано, що хромосомспецифічні ДНК-зонди для центромірних районів хромосом людини (13, 18, 21, X і Y) можна ефективно використовувати для виявлення аномалій каріотипу.

Встановлено, що комплексне цитогенетичне молекулярно-цитогенетичне дослідження підвищує точність медично-генетичного прогнозу. Застосовані методи дозволили виявити ті форми хромосомної патології, які часто залишаються недіагностованими (маркерні хромосоми, мозаїцизм з числом аномальних клітин до 20%).

Для діагностики мозаїцизму гомозом використане молекулярно-цитогенетичне дослідження інтерфазних ядер.

ПРАКТИЧНА ЦІННІСТЬ РОБОТИ. Використання нерадіоактивного варіанта гібридизації *in situ* прискорює отримання точного цитогенетичного діагнозу в 2-3 рази проти методу радіоактивного. Отримані дані дозволили підвищити ефективність і точність ранньої пренатальної діагностики хромосомних хвороб плоду. Розроблені підходи до більш точної молекулярно-цитогенетичної діагностики, які дозволяють скоротити час дослідження і підвищити його ефективність під час використання в роботі медично-генетичних центрів.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ. Матеріали дисертації були представлені на засіданні відділів МНД і педіатрії і дитячої хірургії (відділу вроджених і спадкових захворювань у дітей з порушенням психіки і лабораторії молекулярної цитогенетики нервово-психічних захворювань; лабораторії цитогенетики Научного центру психічного здоров'я РАН) (Москва, 1993); і Мі-

народному Симпозиумі "Ультразвукова діагностика в перинатології і гінекології" (Балаклея, 1993); І з'їзді Російської асоціації лікарів УЗД перинатології і гінекології (Москва, 1992); ІІІ Інтернаціональній конференції з ранньої пренатальної діагностики (Єрусалим, Ізраїль, 1994).

ПУБЛІКАЦІЇ. На тему дисертації опубліковано 5 робіт. Молекулярно-цитогенетичні дослідження і більша частина постнатальних і пренатальних аналізів зроблені автором.

ЗМІСТ І ОБСЯГ РОБОТИ. Дисертаційна робота викладена на 143 стор. машинописного тексту, складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, чотирьох розділів дослідження з викладанням отриманих результатів, закінчення, висновків і списку цитованої літератури.

Робота містить 10 таблиць, 11 малюнків.

ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВІНЕСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ. 1. Молекулярно-цитогенетичний аналіз інтерфазних клітинних ядер, гібридизованих *in situ*, є високодостовірним методом, що дозволяє здійснювати ефективну діагностику хромосомних анеуплоїдій і складних випадків хромосомного мозаїцизму.

2. Використання комплексного цитогенетичного і молекулярно-цитогенетичного аналізу у хворих з високим ризиком хромосомних аномалій дозволяє виявляти носіїв маркерних хромосом і мозаїк з невеликим числом аномальних клітин.

3. Оптимізовані умови флуоресцентної гібридизації *in situ* ДНК-зондів для центромірних районів хромосом 18, X і Y дозволяють надійно ідентифікувати ці хромосоми в інтерфазних клітинах.

4. ДНК-зонди альфа-RI-18 і альфа-RI-6 для центромірних районів хромосом 13 і 21 дозволяють точно ідентифікувати ці хромосоми тільки в метафазних ядрах.

ЗМІСТ РОБОТИ

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Виходячи з поставлених завдань, основним матеріалом дослідження були клітини ворсин хоріона (КВХ), лімфоцити пуповинної крові, лімфоцити периферійної крові.

Вказаний матеріал був взятий: в групі індивідуумів, направлених на цитогенетичне дослідження по показам, прийнятим в клінічній генетиці (I група); в групі вагітних жінок, направлених на ПД по генетичним показам (II група); в контрольній групі, що складалась із здорових індивідуумів.

Нами було проаналізовано 360 постнатальних і 52 пренатальних випадків, з них в 38 проводилось комплексне молекулярно-цитогенетичне дослідження. Крім того, цитогенетичними методами обстежено 50 індивідуумів контрольної групи.

Для кожного індивідуума з I і 30 з контрольної групи проведено традиційне цитогенетичне дослідження з застосуванням методу культивування лімфоцитів периферійної крові. В II групі в 31 випадку проведений аналіз препаратів виготовлених із некультивованих КВХ (Баранов В.С. та ін., 1989), а в 21 випадку - дослідження пуповинної крові плоду, отриманої з допомогою кордоцентеза і дослідженої стандартним методом культивування лімфоцитів (Захаров А.Ф. та ін., 1982). Р контролі для II групи, що складається з 20 вагітних, направлених на переривання через особисті мотиви, проведений аналіз препаратів, виготовлених із КВХ.

Молекулярно-цитогенетичний аналіз був проведений з використанням ДНК-зондів альфа-RI-18, альфа-PI-6, альфа-RI-22, рУАМ 12-40, рPD18, специфічних для центромірних районів хромосом 13, 21, 18, 9 і 9 відповідно. В роботі використовували метод радіоактивної гібридизації нуклеїнових кислот in

situ (Gall J. G., Pardue M. L., 1971; Chandler M. E., Yunis J.J., 1978) з модифікаціями, запропонованими Шровиць Ю.Б. (1984) і метод нерадіоактивної гібридизації *in situ* (Pinkel D. et al., 1986). Результати обробляли з допомогою стандартних статистичних методів (Закс Л., 1976).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ПОСТНАТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ. Цитогенетичне обстеження проведене 360 індивідуумам. Серед них хворі з первинною аменореею, недорозвитком вторинних статевих ознак, затриманням статевого дозрівання в поєднанні з розумовою відсталістю або девіантною формою поведінки (11,9%); з підозрою на синдром Шерешевського-Тернера і синдром Клайнфельтера (14,3%); з аномаліями статевого диференціювання в дорослих і дітей (2,2%); з багатьма вродженими вадами розвитку і (або) MAP (35,3%); з мертвородженням, з підозрою на ту чи іншу форму анеуплоїдії (36,1%). У 96 (26,6%) обстежених виявлені хромосомні аномалії. Хромосомні порушення зустрічались у вигляді: 1) численних аномалій аутосом - у 44; 2) численних аномалій гоносом - у 7; 3) мозаїкових форм - у 40; 4) структурних перебудов - у 4; 5) маркерних хромосом - у 1 (табл. 1). В контрольній групі хромосомних аномалій не виявлено. Масова частка хромосомних аномалій в групі з МВНР і (або) MAP склала 55,2%; при підозрі на синдром Тернера і синдром Клайнфельтера - 34,4%; в групі з аменореею - 9,4%; при порушенні статевого диференціювання - 1% від загальної кількості виявлених патологій, що відповідає даним, які наводяться в літературі (мал. 1).

З 360 обстежених індивідуумів цитогенетичними методами в 19 (5,27%) випадках було неможливо ідентифікувати гоносомний

мозаїцизм з незначною часткою аномального клону. Тому в цих випадках були застосовані молекулярно-цитогенетичні методи.

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ПРЕНАТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ. Використовувачи методи отримання "прямих" хромосомних препаратів з біоптата хоріона і хромосомних препаратів з культури лімфоцитів пуповинної крові плоду, проведене обстеження матеріалу від 52 вагітних жінок, направлених на ПД з такими генетичними показами: 1) попереднє народження дитини з синдромом Дауна (14 випадків) або багатьма ВПР (10 випадків); 2) похилий вік вагітної жінки (12 випадків); 3) тератогенна дія на плід (9 випадків); 4) спонтанні аборти на ранніх термінах (4 випадки); 5) захворювання, пов'язані з статтю (3 випадки).

В результаті пренатального обстеження 52 вагітних жінок, хромосомна патологія в плоду виявлена в 4 випадках і в 2 випадках, обстежених в зв'язку з гемофілією, виявлена чоловіча стать плоду. Встановлені наступні каріотиби з хромосомною патологією: 46,XX/45,X; 47,XY,+21/46,XY и в двох випадках 47,XY,+21. Вагітності, при виявленні хромосомних аномалій, були перервані і діагнози верифіковані.

Після проведення інвазивних процедур у вагітних жінок повідомлення про спонтанні викиди не зареєстровані. Всі вагітності закінчились нормальними пологами, народились діти без будь-якої вродженої патології.

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ПОСТНАТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ. Після проведення постнатальної цитогенетичної діагностики в 19 випадках (5,27%) не вдалось встановити точний діагноз. З них: 1 випадок з маркерною додатковою хромосомою; 4 - з анеуплоїдією аутосом; 12 - з гоносомним мозаїцизмом; 1 - з поєднаною патологією синдрому Тернера і Едвардса; 1 - з гермафродитизмом (табл. 2).

У пацієнта з фенотипними ознаками синдрому Дауна дослідження з допомогою диференційного пофарбування дозволили ідентифікувати походження маркерної хромосоми. Після проведення радіоактивної гібридизації *in situ* з застосуванням хромосомоспецифічного ДНК-зонду альфа-RI-6 вдалось з'ясувати походження маркерної хромосоми, яка була дериватом (der) 21 хромосоми.

З 12 пробандів з підозрою на гоносомний мозаїцизм після проведення "класичної" цитогенетичної діагностики, 8 проведена радіоактивна гібридизація нуклеїнових кислот *in situ* і 4 - FISH гібридизація. З них: 4 - з припущеним аномальним клоном 45,X (синдром Шершевського-Тернера), 6 - з синдромом Клайнфельтера і 2 - з синдромом трипло-Х. На основі схеми аналізу мозаїцизму у всіх 12 випадках обстежених цитогенетичними методами можна було виключити аномальний клон, так як на 17-23 нормальні клітини зустрічались 1-2 аномальні. Проте, враховуючи присутність клінічних ознак хромосомної хвороби в пацієнтів, а також виявлення аномальних клітин, нами була проведена молекулярно-цитогенетична діагностика. У всіх випадках з гоносомним мозаїцизмом проведений аналіз хромосом, як в метафазних, так і в інтерфазних клітинах. Після чого в індивідів з підозрою на трипло-Х в одному випадку діагноз підтвердився (10% аномальних клітин), а в іншому - всі клітини виявились нормальними.

При обстеженні пацієнтів з синдромом Тернера і синдромом Клайнфельтера діагнози, встановлені цитогенетичними методами, підтверджені.

Таким чином, з допомогою ДНК-діагностики вдалось підтвердити 11 (91,6%) припущених діагнозів з 12, направлених на молекулярно-цитогенетичну діагностику з підозрою на гоносом-

ний мозаїцизм.

З 4 випадків анеуплоїдії аутосом в одному випадку проведена радіоактивна гібридизація *in situ*, в трьох - FISH гібридизація. З них: 3 - з мозаїковою формою синдрому Дауна, 1 - з синдромом Едвардса. При застосуванні хромосомспецифічного ДНК-зонду альфа-RI-22 встановлений діагноз синдрому Едвардса в інтефазних і метафазних клітинах, причому мозаїкова форма з аномальним клоном 30%. При використанні ДНК-зонда, специфічного для хромосом 13 і 21, в метафазних клітинах був підтверджений у всіх трьох випадках мозаїковий варіант хвороби Дауна.

Комбінуючи цитогенетичний і молекулярно-цитогенетичний метод аналізу аномалій хромосом, при використанні двох хромосомоспецифічних ДНК-зондів альфа-RI-22, рYAM 10-40, встановлений в одному випадку каріотип 46,XX/45,X/47,XX,+18 з співвідношенням клонів 50%/40%/10%, а при застосуванні ДНК-зонда рPD18 підтверджений каріотип 46,XU/45,X, причому з незначною часткою (12%) нормального клона 46,XU.

Таким чином, з допомогою хромосомоспецифічних ДНК-зондів можна проводити ефективну діагностику складних випадків хромосомного мозаїцизму, визначати численні зміни анеуплоїдії аутосом.

Молекулярно-цитогенетичні методи аналізу каріотипа людини і клоновані фрагменти ДНК людини (хромосомоспецифічні ДНК-зонди) дозволяють більш точно і ефективно визначати особливості хромосомного набору. Проте, застосування метода нерадіоактивної гібридизації *in situ* ускладниться тому, що ДНК-зонди при різноманітних умовах гібридизації можуть містити окремі гомологічні хромосоми і окремі групи хромосом.

Змінюючи умови проведення нерадіоактивної гібридизації *in*

situ вдалось встановити, що ДНК-зонди альфа-RI-22, рУАМ 10-40, рPD18 специфічні для центромірних районів хромосом 18, X і Y відповідно при гібридизації в специфічних умовах експеримента (гібридизація в суміші 2xSSC, 50% формамід при 42 С і відмивка хромосомних препаратів у суміші 0,1xSSC, 50% формамід) дозволяють надійно ідентифікувати хромосоми 18, X і Y в метафазних і інтерфазних клітинах. Використовуючи ДНК-зонди альфа-RI-18 і альфа-RI-6, специфічні для центромірних районів хромосом 13 і 21, при гібридизації в оптимізованих умовах експеримента не дозволяють ідентифікувати ці хромосоми в інтерфазних ядрах з-за артефактів, пов'язаних з асоціаціями акроцентричних хромосом в інтерфазному ядрі.

Для оцінки можливості використання метода нерадіоактивної гібридизації з метов визначення числа хромосом 13, 18, 21, X і Y в інтерфазних клітинах проаналізували 8 зразків периферійної крові пацієнтів з нормальним каріотипом.

В досліджуваних зразках без патології визначали співвідношення частот ядер з різноманітним числом сигналів нерадіоактивної мітки (табл. 3, 4). Результати досліджень статевих хромосом показали, що: 1) більше 96% ядер в клітинах з каріотипом 46,XY містять один сигнал нерадіоактивної мітки при використанні ДНК-зонда рУАМ 10-40 і більше 95% ядер - містять один сигнал при використанні ДНК-зонда рPD18; 2) більше 90% ядер в клітинах з каріотипом 46,XX мають два сигнали біотинильованої мітки при використанні ДНК-зонда рУАМ 10-40, а аналіз жіночого каріотипу з допомогою ДНК-зонда рPD18, специфічного для хромосоми Y, продемонстрував відсутність сигналу в 98% інтерфазних ядер (мал. 2). Таким чином, інтерфазний аналіз з використанням ДНК-зондів рУАМ

10-40, рРD18, специфічних для центромірних районів хромосом X і Y відповідно, дозволяє легко розрізняти жіночий і чоловічий каріотип.

Результати аналізу аутосом, отримані при дослідженні нормальних зразків з допомогою ДНК-зондів альфа-R1-18, альфа-R1-6, альфа-R1-22, специфічних для центромірних районів хромосом 13, 21 і 18 відповідно показали, що: 1) при використанні ДНК-зонда альфа-R1-22 в середньому 90% гібридизованих інтерфазних ядер демонструють два сигнали біогінільованої мітки, і не більше 3% ядер дають три гібридизаційних сигнали; 2) при використанні ДНК-зондів альфа-R1-18 і альфа-R1-6 найбільша кількість інтерфазних клітин містили 4 сигнали нерадіоактивної мітки, що склало в середньому для хромосоми 13-52,2%; для хромосоми 21-48,4% (мал. 3). Розподіл ядер з трьома сигналами в нормальних зразках, дозволив зробити висновок про те, що при гібридизації ДНК-зонд альфа-R1-22 точно ідентифікує хромосоми 18 в інтерфазному ядрі, а ДНК-зонди альфа-R1-18 і альфа-R1-6 не дозволяють точно визначати число хромосом 13 і 21 в інтерфазному ядрі.

В процесі дослідження можливості використання інтерфазного аналізу в медичній практиці нами були проаналізовані три зразки з аномальним каріотипом (46,XX/47,XX,+18; 45,X/46,XY; 46,XY/47,XXY) і проведений порівняльний аналіз частоти розподілу нерадіоактивної мітки в зразках з нормою і патологією (мал. 4 (а, б, в)). Проведений статистичний аналіз розподілу сигналів нерадіоактивної мітки в інтерфазних ядрах дозволяє зробити висновок про те, що аномальні і нормальні каріотипи достовірно можна розрізнити.

Таким чином, отримані дані свідчать про можливість проведення діагностики хромосомної патології, аналізуючи не тільки

ки метафазні, але і інтерфазні ядра після, нерадіоактивної гібридизації з хромосомспецифічними ДНК-зондами рУАМ 10-40, рРD18 і альфа-RI-22.

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ПРЕНАТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ. Метод флуоросцентної гібридизації нуклеїнових кислот (FISH) був застосований пренатально в 17 випадках на некультивованих клітинах ворсин хоріона. На культивованих клітинах лімфоцитів пуповинної крові плоду нерадіоактивну гібридизацію використовували в двох випадках. В результаті молекулярного дослідження з використанням ДНК-зонда рУАМ 10-40, встановлений каріотип 46,XX/45,X, а при використанні ДНК-зонда альфа-RI-6 виявлений каріотип 47,XY,+21, що повністю підтвердило достовірність "класичного" цитогенетичного дослідження, проведеного нами на зразках пуповинної крові. В першому спостереженні з синдромом Шерешевського-Тернера було проведено дослідження як метафазних, так і інтерфазних клітин. Встановлено, що результати інтерфазного аналізу повністю співпадають з діагнозом, виявленим на метафазних пластинках крові плоду.

В двох інших спостереженнях з трисомією по хромосомі 21 (47,XX,+21; 46,XY/47,XY,+21), виявлених в некультивованих ворсинах хоріона, проведена гібридизація нуклеїнових кислот *in situ* для виключення або підтвердження мозаїцизму. При застосуванні хромосомспецифічного ДНК-зонда альфа-RI-6 на метафазних клітинах були підтверджені цитогенетичні діагнози: синдром Дауна в першому випадку і мозаїкова форма трисомії 21 з аномальним клоном в 30% - в другому.

В 15 зразках з нормальним каріотипом, встановленим в КВХ, молекулярно-цитогенетичне дослідження проводили з метою виключення помилки в пост вленні діагнозів і для визначення

надійності пренатальної ідентифікації статі плоду. При гібридизації у всіх зразках застосовувались ДНК-зонди альфа-RI-6 на метафазних пластинках і рYAM 10-40 або рPD18, як на метафазних, так і на інтерфазних пластинках. На основі інтерфазного аналізу хромосом після флуоресцентної гібридизації нуклеїнових кислот були виявлені 9 плодів чоловічої і 6 жіночої статі. В одному випадку встановлена помилка в діагностиці статі цитогенетичним методом. Використання метода флуоресцентної гібридизації демонструє сувору специфічність хромосом X, Y і підтверджує повну надійність пренатальної ідентифікації статі, як на стадії метафази, так і в інтерфазі.

Таким чином, метод флуоресцентної гібридизації нуклеїнових кислот дозволяє здійснювати діагностику утросомної патології (анеуплоїдії, мозаїцизма) в пренатальний період на стадії метафази. При використанні ДНК-зондів, специфічних для центромірних районів хромосом X, Y - і в інтерфазному ядрі. При обстеженні каріотипу методом флуоресцентної гібридизації вдається здійснити швидке визначення основних хромосомних хвороб на протязі 2-3 днів після отримання цитогенетичних препаратів на відміну від 7-9 днів при використанні радіоактивного методу, що суттєво підвищує ефективність діагностики.

ВИСНОВКІ

1) Проведено 412 цитогенетичних дослідження у вагітних та хворих з підозрою на спадкову патологію. У 100 (24,3%) з них виявлені хромосомні аномалії, уточнення яких було необхідним в 38 випадках молекулярно-цитогенетичними методами.

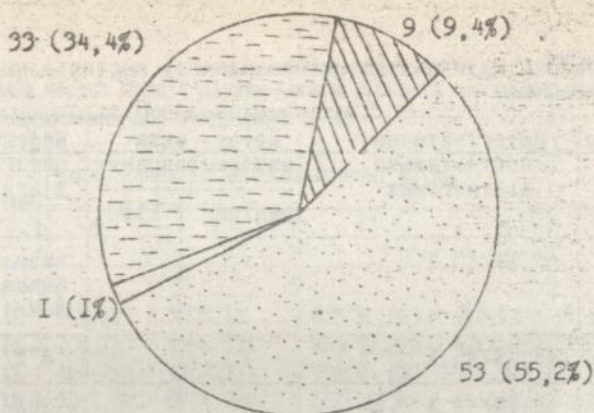
2) Оптимізовані умови флуоресцентної гібридизації *in situ*

ДНК-зондів для центромірних районів хромосом 18, X і Y, які дозволяють надійно ідентифікувати ці хромосоми в інтерфазних клітинах при проведенні пост- і пренатальної діагностики.





3) Асоціації акроцентричних хромосом, наявність накладень в інтерфазних клітинах і феномен гетероморфізма гомологічних хромосом по змісту центромірних послідовностей ДНК приводить до зменшення числа інформативних ядер, що не дозволяє застосовувати ДНК-зонди, специфічні для хромосом 13 і 21 при інтерфазному аналізі в постнатальній і пренатальній діагностиці.

4) Флуоресцентна гібридизація *in situ* з використанням ДНК-зондів, загальних для хромосом 13 і 21, дозволяє ефективно ідентифікувати ці хромосоми тільки в метафазних клітинах.

5) Практичне застосування хромосомоспецифічних ДНК-зондів, які маркують центромірні райони хромосом 13, 18, 21, X і Y, дозволяє здійснювати комплексну молекулярно-цитогенетичну діагностику основних хромосомних аномалій у людини, пов'язаних з численними порушеннями статевих хромосом і аутосом (синдром Клайнфельтера, синдром Шерешевського-Тернера, синдром трипло-Х, синдром Едвардса, синдром Дауна).



Мад. 1. Піктома вага хромосомних аномалій в постнатальній діагностиці:

-  - гермафродитизм;
-  - аменорея;
-  - синдром Тернера і Клайнфельтера;
-  - МВІР і (або) МАР

Таблиця 1

Результати аналізу хромосомних аномалій в цитогенетичній постнатальній діагностиці

Всього	Хромосомні аномалії				
	анеуплоїдії аутосом	анеуплоїдії гоносом	моє.кові випадки	структурні переміщення	маркерні хромосоми
360	44 (12,2%)	7 (1,9%)	40 (11,1%)	4 (1,1%)	1 (0,3%)

Таблиця 2

Результати молекулярно-цитогенетичної постнатальної діагностики

число ви-падків	Цитогенетична постнатальна діагностика	Метод, який використовували		Молекулярно-цитогенетична діагностика
		радіоак.	FISH.	
1.	46,XX/45,X	+	-	визначення числа аномальних клітин 90%/10%
2.	46,XX/45,X	+	-	87%/13%
3.	46,XX/45,X	+	-	90%/10%
4.	46,XX/45,X	-	+	84%/16%
5.	46,XX/47,XXX	+	-	90%/10%
6.	46,XX/47,XXX	-	+	46,XX
7.	46,X _Y /47,XX _Y	+	-	88%/12%
8.	46,X _Y /47,XX _Y	+	-	90%/10%
9.	46,X _Y /47,XX _Y	-	+	87%/13%
10.	46,X _Y /47,XX _Y	-	+	80%/20%
11.	46,X _Y /47,XX _Y	+	-	85%/15%
12.	46,X _Y /47,XX _Y	+	-	82%/18%
13.	46,XX/45,X/47,XX,+18	-	+	50%/40%/10%
14.	46,X _Y /45,X	-	+	12%/88%
15.	46,XX/47,XX,+18	-	+	70%/30%
16.	46,XX/47,XX,+21	+	-	60%/40%
17.	46,X _Y /47,X _Y +21	-	+	25%/75%
18.	46,XX/47,XX,+21	-	+	80%/20%
19.	47,XX,+mar	-	-	der 21

Таблиця 3

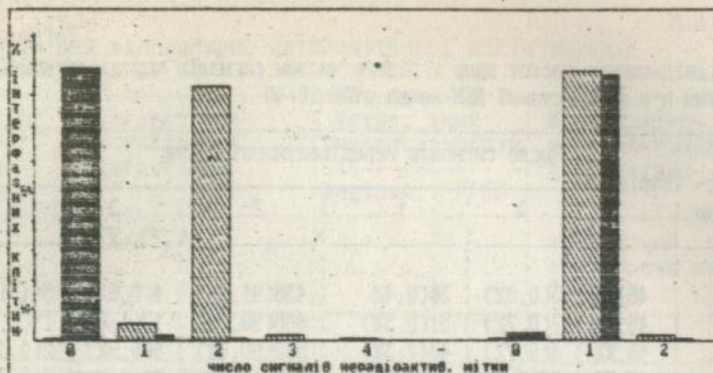
Співвідношення частот ядер з різним числом сигналів нерадіоактивної мітки при використанні ДНК-зонда рУАМ 10-40

N дос- ліда	Кариотип	Число сигналів нерадіоактивної мітки				
		0	1	2	3	4
1.	46,XX	3(0,6%)	30(6,4%)	438(91,2%)	4(0,8%)	5(1,1%)
2.	46,XX	7(0,7%)	51(5,3%)	866(90,2%)	17(1,8%)	19(2,0%)
3.	46,XX	4(0,7%)	43(7,3%)	532(90,8%)	5(0,9%)	2(0,3%)
4.	46,XX	12(1,0%)	57(4,7%)	1121(92,8%)	10(0,8%)	8(0,7%)
5.	46,XY	8(1,5%)	491(96,7%)	9(1,8%)	-	-
6.	46,XY	6(0,7%)	840(97,2%)	18(2,1%)	-	-
7.	46,XY	9(0,9%)	1025(97,6%)	16(1,5%)	-	-
8.	46,XY	8(0,9%)	907(97,5%)	15(1,6%)	-	-

Таблиця 4

Співвідношення частот ядер з різним числом сигналів нерадіоактивної мітки при використанні ДНК-зонда рРD18

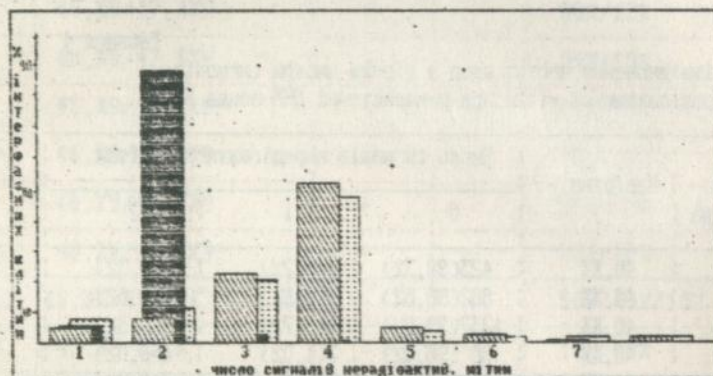
N дос- ліда	Кариотип	Число сигналів нерадіоактивної мітки		
		0	1	2
1.	46,XX	423(98,3%)	5(1,2%)	2(0,5%)
2.	46,XX	862(98,6%)	7(0,8%)	5(0,6%)
3.	46,XX	1237(99,0%)	9(0,7%)	4(0,3%)
4.	46,XX	66(98,4%)	7(1,0%)	4(0,6%)
5.	46,XY	*1(3,2%)	326(95,9%)	3(0,9%)
6.	46,XY	16(2,8%)	553(96,2%)	6(1,0%)
7.	46,XY	15(2,8%)	516(96,3%)	5(0,9%)
8.	46,XY	16(2,3%)	690(97,0%)	5(0,7%)



Мал. 2. Результати флуоресцентної гібридизації в зразках з нормальним каріотипом при використанні ДНК-зондів рУАМ 10-40 і рРD18, специфічних до центромерних районів хромосоми X і Y відповідно:

▨ - для хромосоми X;

■ - для хромосоми Y

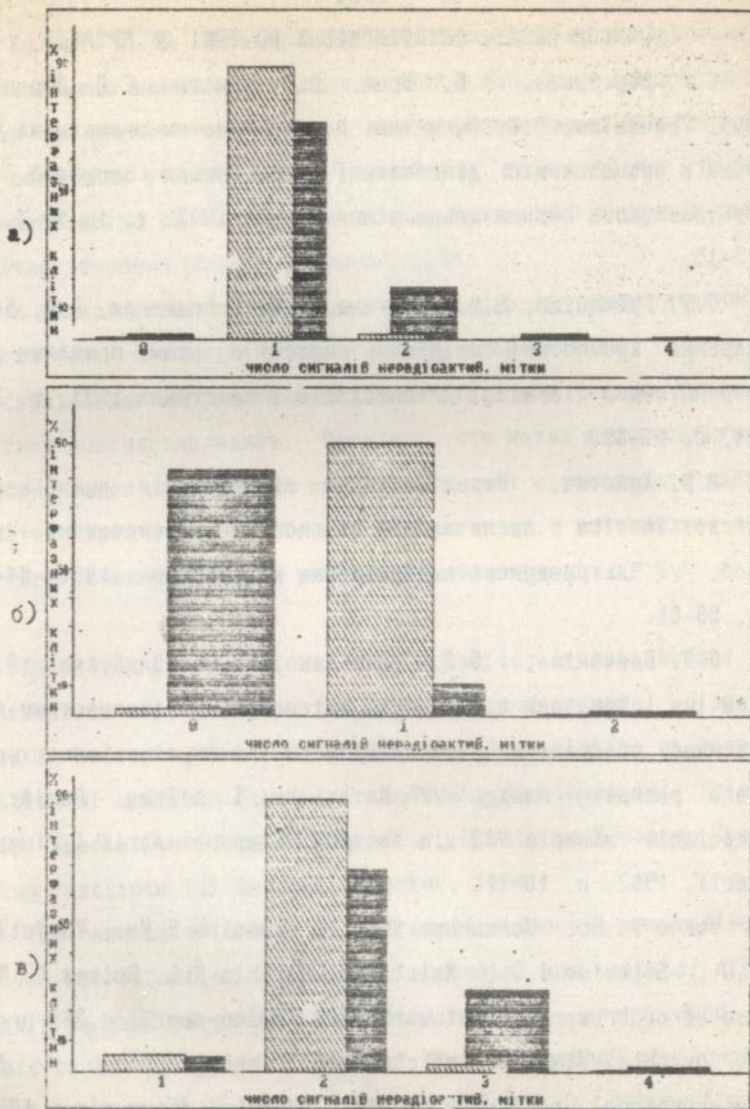


Мал. 3. Результати флуоресцентної гібридизації при дослідженні зразків з нормальним каріотипом з допомогою ДНК-зондів альфа-RI-18, альфа-RI-22, альфа-RI-6, специфічних до центромерних районів хромосоми 13, 18, 21 відповідно:

▨ - для хромосоми 13;

■ - для хромосоми 18;

□ - для хромосоми 21



Мал. 4. Розподіл сигналів нерадіоактивної нітки в зразках з нормальними і аномальними каріотипами:

а) результати FISH гібридизації в зразках з каріотипом 46,XY і 6,XY/47,XXY (співвідношення клонів 80%/20%) при використанні ДНК-зонда pYAM 10-40, специфічного для центрального району хромосоми X: - при нормі; - при патології;

б) результати FISH гібридизації в зразках з каріотипом 46,XY і 45,X/46,XY (співвідношення клонів 88%/12%) при використанні ДНК-зонда pPD18, специфічного для центрального району хромосоми Y: - при нормі; - при патології;

в) результати FISH гібридизації в зразках з каріотипом 46,X і 46,XX/47,XX,+18 (співвідношення клонів 70%/30%) при використанні ДНК-зонда альфа-N1-22, специфічного для ділянки центрального району хромосоми 18: - при нормі; - при патології.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

С.Г. Ворсанова, Ш.Б. Шров, А.В. Христич, Г.Л. Доронін, О.Я. Гречаніна, В.Ю. Бусигіна. Молекулярно-цитогенетичні методи в пренатальній діагностиці хромосомних аномалій. // Ультразвукова перинатальна діагностика. 1993, т. 1, №2-3, с. 13-15.

О.Я. Гречаніна, Е.А. Песогіна, Е.Н. Бабаджанян, А.В. Бондаренко. Хромосомні синдроми в системі аутосом, проблеми диференційного діагнозу. // Цитологія і генетика. 1993, т. 27, №4, с. 61-65.

А.В. Христич. Нерадіоактивна гібридизація нуклеїнових кислот *in situ* в пренатальній діагностиці хромосомних хвороб. // Ультразвукова перинатальна діагностика. 1994, №4-5, с. 58-61.

О.Я. Гречаніна, О.Я. Яковенко, О.П. Здибська, А.В. Христич. Вивчення підходів до антенатальної діагностики генетично обумовлених форм синдрому затримки внутрішньоутробного розвитку плоду. // Матеріали I з'їзду Російської асоціації лікарів УЗД діагностики в перинатології і гінекології. 1992, с. 16-17.

Yurov Yu.B., Vorsanova S.G., Grechanina E.Ya., Khristich A.V., Soloviov I.V., Malet P., Doronin G.L. Roizes G. The use of centromeric, telomeric and region-specific DNA probe for prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies. // IIU International conferens on early prenatal diagnosis. 1994. May 22-27, Israil, Jerusalem, p. 142.

Христинич А. В. Молекулярно-цитогенетические исследования хромосомных аномалий в постнатальной и пренатальной диагностике при медико-генетическом консультировании. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Специальность 03.00.15. - генетика, Украинский институт усовершенствования врачей, Харьков, 1994.

В данной работе представлены результаты практического применения метода нерадиоактивной гибридизации *in situ* в постнатальной и пренатальной диагностике при медико-генетическом консультировании. Показано, что метод флуоресцентной гибридизации нуклеиновых кислот позволяет осуществлять диагностику хромосомной патологии (анеуплоидий, мозаицизма) как в постнатальный, так и в пренатальный период.

Khrystich A. V. Molecular-cytogenetics investigations of chromosome abnormalities for postnatal and prenatal diagnosis in medical-genetic consultation. Dissertation on competition of academic degree of candidate of biological sciences. Speciality 03.00.15 - genetic, Ukrainian Advanced Training Institute for Doctors, Kharkov, 1994.

The results of the practical application of non-radioactive hybridization *in situ* for postnatal and prenatal diagnosis in medical-genetic consultation were represented at this work. It has been shown, that the method of fluorescent hybridisation of nuclei acids allows to diagnose the chromosomal pathology in postnatal and prenatal period.

Ключові слова: молекулярно-цитогенетичні дослідження, анеуплоїдії, хоріоцентез, кордоцентез, гібридизація нуклеїнових кислот *in situ*, хромосомні аномалії, мозаїцизм.

Відповідальний за випуск Христинич А.В.

Підписано до друку 04.10.94. Формат папіру 60x84.

Заказ N _____, Тираж 100 экз.

Типографія

AB 31.178

AB 31.178