

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВИЙ ПІПІЄНІЧНИЙ ЦЕНТР**

На правах рукопису

НІКОЛЕНКО
Маргарита Іванівна

**ВИКОРИСТАННЯ СКРИНІНГУ МАРКЕРІВ
МАТЕРИНСЬКОЇ СИРОВАТКИ
В ДІАГНОСТИЦІ ПРИРОДЖЕНИХ
ВАД РОЗВИТКУ ТА ХРОМОСОМНОЇ
ПАТОЛОГІЇ ПЛОДА**

03.00.15 – генетика (біологічні науки)

М.Николенко

Автореферат дисертації
на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ – 1997

575

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00751836 (U)

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Донецькому міжобласному медико-гігієнічному центрі

Наукові керівники:

доктор медичних наук,
професор
Ігор Романович Бариляк

кандидат медичних наук
Світлана Борисівна Арбузова

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук
Генрі Карлосович Парсаданян

кандидат медичних наук, ст.н.п.
Галина Володимирівна Скибан

Провідна організація:

Львівський НДІ спадкової
патології МОЗ України

Захист відбудеться "31" березня 1997 р. о "10" годині на засіданні Спеціалізованої Вченої Ради Д 01.37.03 при Українському науковому гігієнічному центрі за адресою: 254660, м.Київ-94, вул. Попудренка, 50.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Українського наукового гігієнічного центру за адресою: 254660, м.Київ-94, вул. Попудренка, 50.

Автореферат розісланий "28" лютого 1997 р.

Вчений секретар
Спеціалізованої Вченої Ради,
кандидат біологічних наук

Г.В.Стефанович

AB-37.025

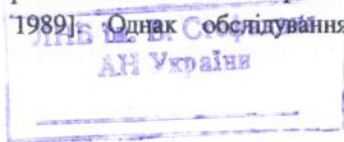
ВСТУП

Актуальність теми. Однією з найважливіших задач медичної генетики в Україні є розвиток методів комплексної пренатальної діагностики природжених вад розвитку (ПВР) та хромосомних захворювань плода. Це обумовлено високою популяційною частотою даної патології, підсиленою несприятливим екологічним станом та наслідками аварії на Чорнобильській АЕС. Важливим етапом комплексної пренатальної діагностики, поряд з ультразвуковими та інвазивними дослідженнями, є скринінг маркерів материнської сироватки (МС), який бере початок у 1972 році, коли вперше було повідомлено про зв'язок підвищеного рівня α -фетопротеїну (АФП) в амніотичній рідині та сироватці матері з аненцефалією плода [Hino et al., 1972; Wald et al., 1972]. З того часу накопичено багато даних про зміни маркерів МС як при ПВР плода [Burton, 1989; Grandall et al., 1983; Wald et al., 1983], так і при хромосомних захворюваннях, зокрема с.Дауна [Cuckle et al., 1984, Mancini et al., 1991, Wald et al., 1996].

На теперішній час скринінг маркерів МС широко використовується у багатьох країнах світу. З одного боку, він підвищує ефективність ультразвукового скринінгу, так як зміна рівня АФП супроводжує ряд ПВР плода, що робить можливим цілеспрямований пошук вад в сформованих групах високого ризику [Дубинина, 1990; Grandall et al., 1991; Szabo et al., 1988]. З іншого, дозволяє оцінити ризик народження дитини з хромосомною патологією, здійснити диференційований підхід до призначення інвазивних досліджень як молодим матерям, так і жінкам старшої вікової групи [Wald and Cuckle, 1988; Fisher et al., 1990; Mancini et al., 1992].

Незважаючи на велику кількість досліджень в галузі скринінгу маркерів МС та показану ефективність в виявленні патологій плода [Chi Le-Ha, 1995; Fisher et al., 1996], на сьогоднішній день ряд проблем залишається актуальним. Остаточо не вирішені питання вибору тактики пренатальної діагностики в групі жінок з підвищеним рівнем АФП, оцінка індивідуального генетичного прогнозу.

Ефективність профілактики хромосомних захворювань, зокрема с.Дауна як найбільш частої патології, залежить від масового проведення скринуючих програм, що підкреслюється в багатьох роботах [Cuckle et al., 1989; Petrosik et al., 1989]. Однак дослідження вагітних з



використанням максимальної кількості маркерів в Україні утруднено. Тому необхідно вибрати маркери, які мають найбільшу діагностичну цінність. Крім того, недостатня інформативність скринінгу с.Дауна порівняно з діагностикою ПВР, наявність помилковонегативних результатів не дозволяють виявити всі плоди с трисомією 21. З іншого боку, одержання помилковопозитивних та перекриваючихся даних завищує показання для інвазивних досліджень. Тому актуальною проблемою є вивчення специфічності зміни сироваточних маркерів при хромосомних захворюваннях; факторів, впливаючих на достовірність результатів.

Остаточо не розроблені методичні та організаційні аспекти скринуючих програм, не визначені оптимальні строки тестування, динаміка змін маркерів в залежності від терміну вагітності, індивідуальна трактовка результатів в оцінці генетичного ризику.

Внаслідок цього, метою дослідження є вивчення ролі скринінгу маркерів материнської сироватки в пренатальній діагностиці природжених вад розвитку та хромосомних захворювань плода.

Завдання дослідження.

1. Визначити базові і граничні рівні маркерів МС в 1 і 2 триместрах вагітності та фактори, які впливають на варіації показників.

2. Встановити характер змін показників в амніотичній рідині (АР) при природжених вадах розвитку та хромосомних захворюваннях плода; оцінити діагностичну значущість біохімічного аналізу амніотичної рідини для виявлення широкого спектра патологій плода.

3. Вивчити інформативність змін маркерів МС при с.Дауна у плода.

4. Оцінити ефективність скринінгу маркерів МС як етапа комплексної пренатальної діагностики ПВР та хромосомних захворювань плода.

Наукова новизна дослідження.

1. Вперше встановлена залежність рівня хоріонічного гонадотропіну (ХГ) в сироватці від віку матері, отримано рівняння регресії, яке дозволяє оцінити результати скринінгу з корекцією на вік.

2. Визначена висока діагностична цінність скринінгу МС АФП для формування груп високого ризику по природженим вадам розвитку з пізньою маніфестацією.

3. Вперше встановлено, що родинні перичентричні інверсії хромосоми 9 у плода супроводжуються змінами МС АФП та ХГ,

подібними до змін при с.Дауна, і являються однією з причин помилковопозитивних результатів.

4. Вперше знайдена пряма кореляційна залежність змін рівней МС АФП та ХГ при трисомії 21 у плода від терміну вагітності, підібрані оптимальні строки тестування для кожного маркера.

5. Створений новий диференційований підхід із врахуванням маркерів МС до формування груп високого генетичного ризику та до призначення інвазивних досліджень.

Теоретична і практична значущість дослідження.

1. Подібна динаміка АФП і ХГ в сироватці та амніотичній рідині у випадках трисомії 21 та перичентричної інверсії хромосоми 9 дозволила виявити додаткові чинники, які повинні враховуватися при формуванні груп високого генетичного ризику.

2. Розроблені базові та граничні рівні АФП та ХГ від 6 до 21 тижня вагітності, які можуть використовуватися в усіх лабораторіях України, які працюють з імуноферментними тест-системами.

3. Вибір оптимальних строків для аналізу маркерів МС при діагностиці с.Дауна дозволив підвищити ефективність скринінгу за рахунок зниження помилковонегативних результатів та матеріальних затрат.

4. Удосконалений традиційний підхід до призначення інвазивних досліджень вагітним віком понад 35 років.

5. Запропонована схема проведення комплексної пренатальної діагностики з використанням скринінгу маркерів МС, яка підвищує виявлення ПВР та хромосомних захворювань плода.

6. Показана необхідність та доцільність врахування результатів маркерів МС для формування груп високого акушерського ризику, що розширює межі традиційного використання скринінгу материнської сироватки.

Впровадження в практику. Одержані результати покладені в основу скринуючих програм, які проводяться Донецьким міжобласним медико-генетичним центром в Донецькій області. Розроблені базові та граничні рівні АФП і ХГ використовуються в лабораторіях Донецького діагностичного центру та Луганського медико-генетичного центру, в роботі жіночих консультацій і пологодопоміжних закладів Донецької та Луганської областей.

Медико-генетичне консультування та призначення інвазивних методів дослідження вагітним старшої вікової групи і пацієнткам, які мають в анамнезі дитину з с.Дауна, проводиться з використанням розробленого диференційованого підходу.

На підставі результатів роботи видані методичні рекомендації "Гормонодіагностика патології вагітності" (Донецьк, 1995).

Завдяки впровадженню скринінгу маркерів МС в Донецькій області з 1992 по 1996 роки питома вага природжених вад розвитку в перинатальній смертності знизилася на 4.5%, в дитячій – на 5,1%.

Основні положення, які виносяться на захист.

1. Основою для проведення скринінгу АФП та ХГ є визначення базових та граничних рівнів; оптимальних строків тестування; факторів, впливаючих на варіації показників.

2. Багаточинний аналіз АФП та ХГ у сироватці і амніотичній рідині дозволяє виявити групи високого генетичного ризику під час вагітності.

3. Використання скринінгу МС АФП та ХГ підвищує ефективність комплексної пренатальної діагностики ПВР та хромосомних захворювань плода.

Особистий внесок в розробку основних положень, які виносяться на захист. Дисертант особисто запровадив проведення скринуючих програм в Донецькій області, розробив анкети для реєстрації вагітних жінок і збору катамнестичних даних. Дисертантом особисто виконувались імуноферментні, імунофлуоресцентні, біохімічні дослідження, а також статистичний аналіз одержаних даних. Автором самостійно опрацьовані результати роботи та підготовлений текст дисертації.

Апробація роботи. Основні положення дисертаційної роботи доповідалися на: Міжнародній конференції "Рання пренатальна діагностика патології плода" (вересень 1990, Прага); Всесоюзній науково-практичній конференції "Пренатальний та неонатальний скринінг" (листопад 1990, Харків); 2-му Всесоюзному з'їзді медичних генетиків (грудень 1990, Алма-Ата); 2-му з'їзді медичних генетиків України (жовтень 1995, Львів); 28 Конгресі Європейського товариства медичних генетиків (квітень 1996, Лондон); Конференції по пренатальній діагностиці в Центральних та Східноєвропейських країнах

(вересень 1996, Прага); обласних, міських та міжрайонних семінарах по медичній генетиці (1990–1996 рр.).

Публікації. По темі дисертації опубліковано 11 друкованих робіт, видані методичні рекомендації, одержано 2 посвідчення на раціоналізаторські пропозиції.

Об'єм та структура роботи. Дисертаційна робота викладена на 136 сторінках машинописного тексту, складається із вступу, огляду літератури, 4 глав власних досліджень, закінчення, висновків, списку літератури. Текст дисертації ілюстрований 18 таблицями та 15 малюнками. Список літератури містить 179 назв.

ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження.

Обстеження вагітних жінок Донецької області на α -фетопротеїн (АФП) та хоріонічний гонадотропін (ХГ) здійснювалось в Донецькому міжобласному медико-генетичному центрі. Аналіз виконувався з 14 по 20 тиждень вагітності. На кожну жінку заповнювалась спеціально розроблена анкета із зазначенням встановленого на УЗД терміну вагітності, анамнестичними даними, відомостями з родоводу, особливостями протікання вагітності.

З 1991 по 1995 рр. обстежено 39435 жінок. Забір венозної крові (4–5 мл) і відділення сироватки виконували в Донецькому ММГЦ та жіночих консультаціях м.Донецька і Донецької області. Амніотичну рідину одержували методом трансабдомінальної аспірації з 17 по 24 тиждень вагітності в Донецькому ММГЦ.

Рівень АФП та ХГ в сироватці матері і амніотичній рідині вимірювали методом імуноферментного аналізу з допомогою тест-систем ІФА "Хоффман-Ля Рош" (Швейцарія) [Staepli et al., 1983]. Рівень гормонів пролактину, прогестерону, естрадіолу визначали в сироватці та амніотичній рідині імунофлуоресцентним методом на діагностичних тест-системах "Delfia" фірми Pharmacia-Callac (Великобританія) [Hemmila, 1985]. Аналіз ацетилхолінестерази (АХЕ) в амніотичній рідині проводився методом електрофорезу по Мухамеджанову [1971].

Базові рівні маркерів виражали у вигляді медіани. Для розрахунку медіан було використано 200 зразків сироватки та 50 зразків амніотичної рідини для кожного тижня вагітності. В контрольну групу для визначення базових рівней маркерів були відібрані жінки, у яких вагітності протікали без ускладнень та закінчилися народженням здорової дитини вагою від 3 до 4 кг. Одержані значення АФП і ХГ виражали складовою від медіани і позначали МоМ за міжнародною термінологією.

Комбінований ризик мати плід з с.Дауна (по рівню МС АФП, ХГ та віку матері) розраховували згідно принципу Wald and Cuckle з допомогою розроблених авторами таблиць [Wald et al., 1987; Cuckle, 1995].

Математична обробка результатів виконувалась на комп'ютері IBM PC/AT 386 з використанням програми STATGRAPHICS версії 3.0 фірми Statistical Graphics Corporation (США).

Результати досліджень та їх обговорення.

Основою для проведення досліджень стала розробка базових та граничних рівней маркерів у сироватці матері і амніотичній рідині з 6 по 21 тиждень вагітності, тому що їх варіювання залежить від методу визначення (табл.1).

Нижня границя норми для МС АФП – 0,6 МоМ, верхня границя норми – 2,5 МоМ. Розмах коливань нормальних значень ХГ від 0,5 до 2 МоМ.

Таблиця 1

Базові та граничні рівні АФП і ХГ в сироватці матері

Термін вагітності (тижд.)	АФП, МЕ/мл		ХГ, мМЕ/мл	
	медіана	нижня-верхня границя	медіана	нижня-верхня границя
6	3,34	2,0–8,35	90,82	45,41–181,64
7	4,18	2,50–10,45	123,72	61,86–247,44
8	6,07	3,64–15,17	153,81	76,90–307,62
9	8,28	4,96–20,70	119,73	59,86–239,46
10	10,51	6,30–26,27	98,69	49,34–197,38
11	12,45	7,47–31,12	96,26	48,13–192,52
12	14,14	8,48–35,35	86,41	43,20–142,82
13	17,73	10,63–44,32	73,14	36,57–146,28
14	23,71	14,22–59,27	67,61	33,80–135,22
15	29,56	17,73–73,90	40,73	20,36–81,46
16	33,25	19,95–83,12	33,95	16,97–67,90
17	39,75	23,85–99,37	33,07	16,53–66,14
18	43,68	26,20–109,20	32,28	16,14–64,56
19	48,28	28,96–120,70	31,75	15,87–63,50
20	53,97	32,38–134,92	31,69	15,84–63,38
21	58,84	35,30–147,10	28,54	14,27–57,08

Фактори, які впливають на варіювання рівней маркерів МС. Важливою умовою підвищення діагностичної цінності маркерів МС у виявленні патології плода є визначення становищ, які приводять до схожих змін АФП і ХГ.

Встановлено, що при вагітностях з патологіями плаценти рівень МС АФП і ХГ підвищується більш ніж у 2 рази порівняно з нормою. Середні значення становили: АФП – $2.42 \pm 0,14$ МоМ, ХГ – $2,69 \pm 0,21$ МоМ (у контрольній групі $1.14 \pm 0,03$ і $1,18 \pm 0,04$ МоМ відповідно,

$P < 0,005$). Виявлена залежність демонструє необхідність цілеспрямованого пошуку при УЗД патологій плаценти у жінок з рівнями МС АФП і ХГ вище 2 МоМ.

Відома залежність АФП і ХГ від ваги матері, соматичних захворювань [Wald et al., 1981; Fisher et al., 1986], але детальне дослідження впливу віку матері на рівень МС ХГ не проводилося. Нами вперше знайдена зворотня кореляційна залежність між віком матері та вмістом МС ХГ ($r = -0,695$, $P < 0,01$), описувана рівнянням

$$y = 1,215 - 0,0048x,$$

де x – вік вагітної, y – очікуваний рівень ХГ.

За допомогою рівняння розраховані вікозалежні середні значення МС ХГ і верхня границя норми, на основі яких потрібно оцінювати результати. На перший погляд, коливання ХГ незначні, від 1,128 МоМ в 20 років до 1,023 МоМ в 40 років. Таке варіювання не впливає на розподіл маркера в нормальній популяції. Однак використання при аналізі МС ХГ корекції на вік матері дозволяє на 25% знизити кількість помилковопозитивних результатів скринінгу, особливо у молодих матерів, для яких верхня границя норми стає вищою.

Аналіз катamnестичних даних показав, що підвищення МС АФП і ХГ спостерігалось також при маловодді (64%), передчасних і ускладнених пологах (71%), народженні дитини вагою менш 2,5 кг (62%), загибелі дитини в ранній неонатальний період (63%). Це вказує на необхідність і доцільність врахування результатів скринінгу МС АФП і ХГ при формуванні груп високого акушерського ризику.

Особливості змін маркерів МС при ПВР плода.

Вивчення динаміки МС АФП при дефектах невральної трубки (ДНТ) та передньої черевної стінки (ДПЧС) плода показало, що α -фетопротеїн різко підвищується проти норми як в сироватці, так і в амніотичній рідині. Рівень МС ХГ порівняно з контрольною групою вирогідно не змінюється. Різні ступені пошкоджень обумовлюють відміну середніх значень АФП при порівнянні окремих патологій ($P < 0,001$): $5,58 \pm 0,29$ МоМ (аненцефалія) і $3,56 \pm 0,16$ МоМ (спино-мозкова кила); $4,22 \pm 0,26$ МоМ (гастрошизис) і $3,05 \pm 0,14$ МоМ (омфалоцеле).

Одержані дані показали, що підвищення МС АФП характерне не тільки для ДНТ та ДПЧС, які в більшості випадків не являють складності для діагностики тільки методом УЗД, але й для нефро-уринарних

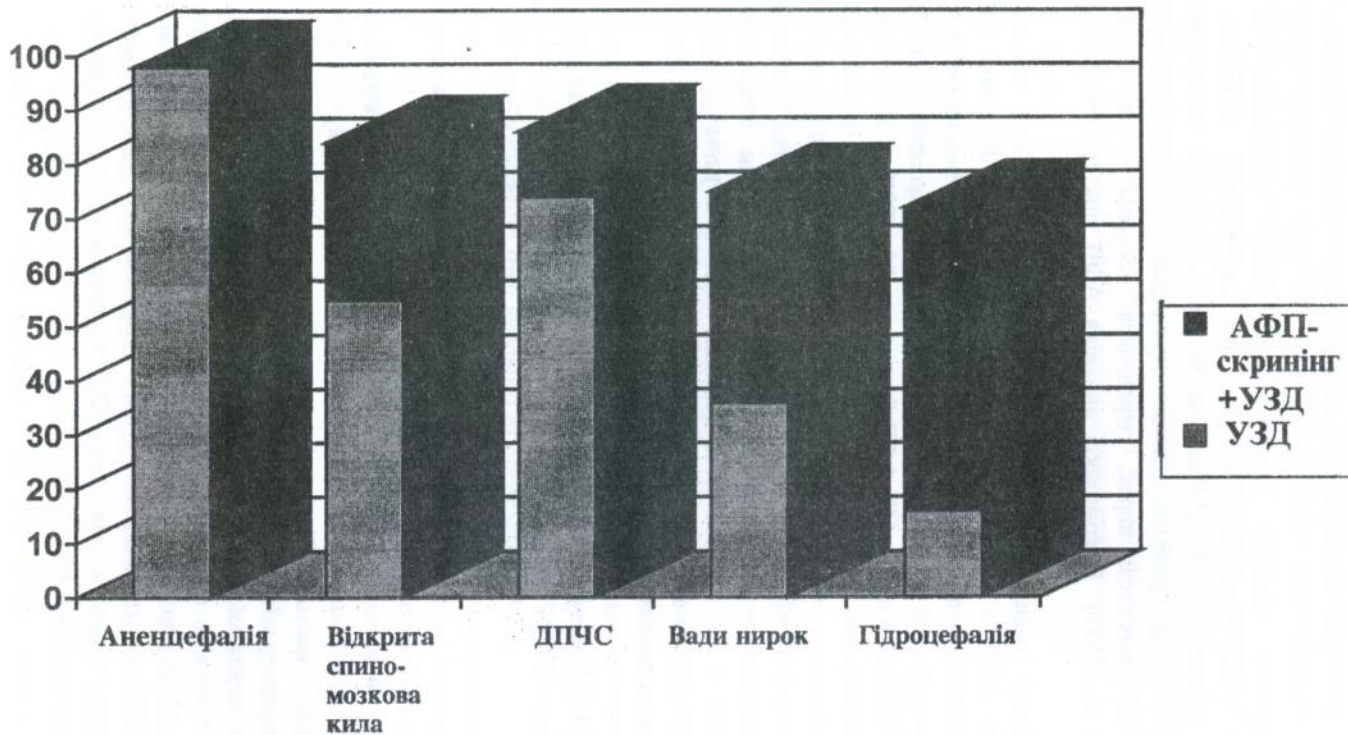
аномалій, патологій шлунково-кишкового тракту, статеві системи. Відмінною рисою цих вад є те, що в ряді випадків вони характеризуються пізньою маніфестацією. Тому візуалізація за допомогою УЗД в терміни, доступні для переривання вагітності, утруднена [Гречаніна, 1992; Ромадіна та інші, 1994]. В літературі зустрічаються тільки уривчасті відомості про підвищення МС АФП при гідронефрозі, полікістозі нирок, гідроцефалії [Seppala et al., 1976; Chemke et al., 1977]. В комплексі динаміка АФП при цих вадах не вивчалася.

Результати наших досліджень переконливо свідчать про те, що підвищення АФП в материнській сироватці, амніотичній рідині та позитивний АХЕ-тест є доклінічною ознакою пізньоманіфестуючих вад розвитку плода, особливо ізольованих вад нирок та гідроцефалії (з 33 виявлених патологій нирок МС АФП був змінений в 100%, а УЗД до 20 тижнів діагностувало тільки 48% випадків). Це обумовлює обов'язкове включення жінок з непояснювано підвищеним рівнем МС АФП в групу високого генетичного ризику, не дивлячись на відсутність вад розвитку при ультразвуковому дослідженні. Подальше обстеження за допомогою вимірів АФП в АР та АХЕ-теста дозволяє оцінити ступінь ризику і вибрати оптимальну тактику пренатальної діагностики із запланованим та цілеспрямованим пошуком ПВР плода.

Оцінка діагностичної значущості АФП-скринінгу в пренатальній діагностиці ПВР плода.

Діагностичну значущість комплексного АФП-скринінгу у діагностиці вад плода можна оцінити, порівнюючи внесок цього метода в виявлення різних груп ПВР плода при УЗД (мал.1).

Аналіз показав, що АФП-скринінг підвищує ефективність ультразвукової діагностики природжених вад розвитку плода. Діагностична цінність АФП-скринінгу різна в залежності від типу ПВР. Так, при аненцефалії 98% виявляємості дають і УЗД, і АФП-скринінг. В діагностиці відкритої спино-мозкової кили та ДПЧС аналіз МС АФП підвищує кількість виявляємої патології при УЗД на 35% і 14% відповідно. Найбільша роль скринінгу АФП в діагностиці ізольованих вад нирок (52%) і гідроцефалії (78%) пояснюється індивідуальним запланованим пошуком вад при УЗД в групах високого ризику, сформованих по рівню МС АФП.



Мал. 1. Роль АФП-скринінгу в виявленні ПВР плода при ультразвуковому дослідженні

Всього в ході обстеження вагітних жінок Донецької області при комплексному використанні скринінгу маркерів МС та УЗД виявлено 227 природжених вад розвитку плода. Ретроспективний аналіз наслідків вагітностей із досліджуваної групи жінок показав, що ступінь виявляємості ПВР плода склав 82,5% (сумарна здатність УЗД в знаходженні розповсюджених вад – 70% [Гречаніна, 1992]).

Таким чином, ефективність пренатальної діагностики ПВР плода при комплексному використанні УЗД та скринінгу МС АФП збільшилася на 12,5%. Оцінити ефект цього збільшення можна на підставі статистичних даних по демографічним показникам.

В м.Донецьку, де скринуюча програма проводиться масово на протязі 3 років, відмічено зменшення кількості новонароджених з ПВР з 24,0 в 1994р. до 20,8 в 1995р. на 1000 народжених живими. В цілому по Донецькій області з урахуванням 41% обсягу всіх вагітних обстеженнями на маркери МС та 69% УЗД-скринінгом, питома вага вроджених аномалій в структурі причин дитячої смертності знизилася з 31,6% в 1994р. до 27,7% в 1995р.

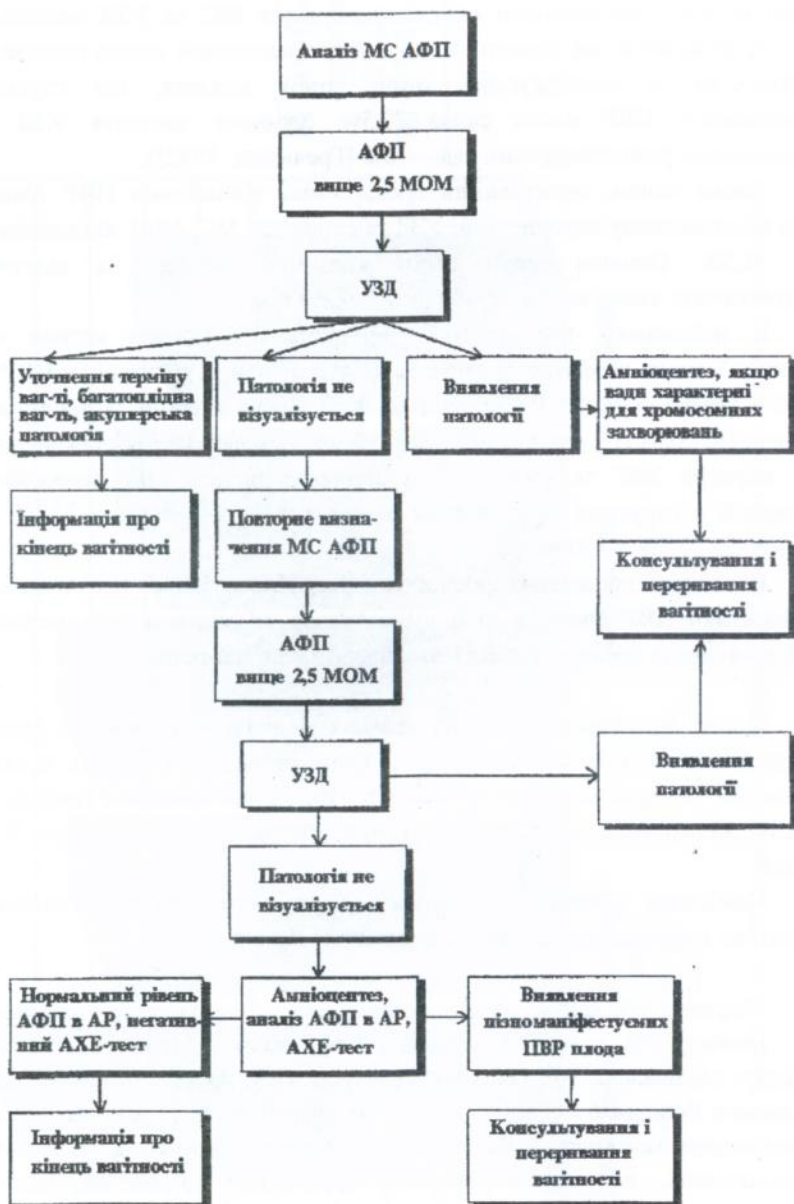
На основі проведених досліджень розроблена схема пренатальної діагностики ПВР плода, в якій взаємозв'язок та спадкоємність методів ПД дозволяють досягти максимального виявлення патології (мал.2).

В ході проведення скринінгу вагітних Донецької області, по рівню маркерів МС АФП і ХГ сформована група ризику (817 жінок), в якій виявлено 40 хромосомних патологій плода, представлених в табл.2, а також 35 випадків сімейних перичентричних інверсій хромосоми 9 у плода.

Найбільшу питому вагу займає с.Дауна, тому детально вивчена динаміка маркерів при цьому захворюванні.

Маркери МС при с.Дауна у плода.

Необхідність розробки методів відбору жінок в групу ризику по с.Дауна обумовлена високою популяційною частотою цієї патології, яка складає в Донецькій області 1 на 736 новонароджених [Арбузова, 1996]. Враховуючи залежність с.Дауна від віку матері, показано в численних дослідженнях, напрям на інвазивну пренатальну діагностику жінок старшої вікової групи є основним методом профілактики трисомії 21 [Palomaki et al., 1987; Wald and Cuckle, 1988]. проте такий підхід на Україні не може вплинути на частоту патології, так як жінки віком



Мал. 2. Схема комплексної пренатальної діагностики ПВР плода

більше 35 років складають серед всіх вагітних не більше 10% [Арбузова, 1996]. Більша частина дітей з с.Дауна народжується молодими матерями, тому проведення масових скринуючих програм для вагітних молодше 35 років являється в цій групі єдиним засобом попередження народження дітей з трисомією 21.

Таблиця 2.

**Хромосомні патології плода в групі вагітних
з високим комбінованим ризиком**

Каріотип плода	Кількість
Трисомія 21	18
Трисомія 18	5
45, XO	4
69, XXX	2
47, XXУ	1
47, XXX	2
46, XX / 47, XX, + mar	3
46, XY / 46, XX	1
47, XX, + mar	2
46, XX, r (22)	1
46, XX, t (4;10) de novo	1
Всього	40

Одержані в ході дослідження результати свідчать про ефективність скринінгу с.Дауна по рівню МС АФП, ХГ та віку матері, в ході якого виявлено та перервано 18 вагітностей з цією патологією, з них 7 плодів у жінок молодших за 35 років. Визначені середні значення маркерів МС при с.Дауна у плода. Рівні АФП виявилися зниженими порівняно з контролем – $0,76 \pm 0,05$ МоМ (в контрольній групі $1,12 \pm 0,06$ МоМ, $P < 0,05$). Значення ХГ збільшені: $2,68 \pm 0,47$ МоМ проти $1,24 \pm 0,08$ МоМ в контрольній групі ($P < 0,05$). Одержані дані узгоджуються з тенденцією, відзначеною багатьма дослідниками – с.Дауна у плода супроводжується зниженням АФП та збільшенням ХГ у сироватці матері [Wald et al., 1988; Vogart et al., 1990]. Зміни хоріогоніна при трисомії 21 більш показові порівняно з АФП: концентрація ХГ перевищувала верхній рівень норми 2 МоМ у 60% випадків, тоді як АФП був нижче

порогового значення 0,6 МоМ тільки в 30%. Отже, діагностична значущість МС ХГ як маркера с.Дауна вища, ніж МС АФП.

Для підвищення точності оцінки результатів скринінгу проведено вивчення залежності значень маркерів від строку тестування. Встановлено, що рівень АФП при трисомії 21 у плода, виміряний в 14–17 тижнів був нижчий порівняно з 17–21 тижнями: $0,54 \pm 0,04$ МоМ та $0,71 \pm 0,05$ МоМ ($P < 0,05$). Середнє значення ХГ в 14–17 тижнів $1,88 \pm 0,31$ МоМ, нижче, ніж в 17–21 тижнів – $2,92 \pm 0,48$ МоМ ($P < 0,05$). Регресійний аналіз виявив пряму кореляційну залежність між рівнями маркерів при с.Дауна та строком виконання аналізу. Коефіцієнти кореляції склали 0,611 для МС АФП, та 0,538 для ХГ ($P < 0,001$). Таким чином, більш виражена зміна маркерів МС і більш ефективно виявлення трисомії 21 досягається при диференційованому вимірюванні маркерів: АФП в 14–16 тижнів, ХГ в 17–21 тижнів вагітності.

Важливим моментом в оцінці результатів скринінгу є вибір порогового комбінованого ризику. При значенні порогового ризику 1:270, який відповідає віковому ризику народження дитини з трисомією 21 для 35-річної жінки у 2 триместрі, вдалося виявити 60% всіх плодів з с.Дауна (18 із 30). Кількість помилковопозитивних результатів склала 5,11%. Одержані дані по ступеню виявлення (60%) при пороговому ризику 1:270 подібні до інших досліджень, які проводилися з використанням 2 маркерів материнської сироватки АФП та ХГ [Cuckle et al., 1989; Goodburn et al., 1994]. Однак кількість помилковопозитивних результатів менша порівняно з даними цих авторів. Це обумовлено тим, що в нашій скринуючій програмі обов'язковим було проведення УЗД перед аналізом маркерів МС, що підвищувало точність при розрахунках комбінованого ризику завдяки вірно встановленому терміну вагітності.

Перицентрична інверсія хромосоми 9 у плода як одна з причин помилковопозитивних результатів скринінгу с.Дауна.

Аналіз каріотипів плодів в групі жінок з високим комбінованим ризиком по трисомії 21 виявив підвищену частоту родинних перицентричних інверсій хромосоми 9, в 90% материнського походження. В літературі повідомлень про таке явище не було. Частота *per inv* (9) в цій групі 1 на 28 амніоцентезів. У випадках *per inv* (9) маркери МС були змінені більш різко порівняно з трисомією 21: середнє значення АФП $0,51 \pm 0,04$ МоМ, ХГ – $5,12 \pm 0,57$ МоМ. Комплексний аналіз амніотичної рідини, приведений в табл. 3, показав, що при

с.Дауна у плода рівень АФП в АР не знижений, як в сироватці. Вміст ХГ в АР значно вищий контролю, аналогічно з сироваткою. Перичентричні інверсії хромосоми 9 у плода супроводжувалися зниженням АФП та ХГ в амніотичній рідині.

Таблиця 3

Вміст АФП і ХГ в сироватці та амніотичній рідині при трисомії 21 і перичентричній інверсії хромосоми 9 у плода (M±m)

Обстежені групи (n = 15)	АФП (МоМ)	ХГ (МоМ)
Трисомія 21		
сироватка	0,67±0,05*	2,68±0,47*
АР	0,96±0,08	3,84±0,46°Δ
Перичентрична інверсія		
сироватка	0,51±0,04°	5,12±0,57°
АР	0,81±0,10*	0,33±0,04°Δ
Контроль (сироватка)	1,12±0,06	1,14±0,08
Контроль АР	1,09±0,06	1,04±0,07

Вірогідність відмінностей порівнянно з контролем:

* – P < 0,05; ° – P < 0,001;

Δ – P < 0,05, вірогідність відмінностей між вмістом маркерів в АР при трисомії 21 і перичентричній інверсії.

Описані ефекти приводять до висновку, що причини збільшення вмісту ХГ в сироватці при цих двох хромосомних порушеннях різні. При с.Дауна підвищення концентрації ХГ відбувається за рахунок посиленого синтезу в трисомній плаценті, що підтверджується даними про підвищення маркера як в сироватці, так і в амніотичній рідині. При перичентричних інверсіях хромосоми 9 спостерігається не посилене продукування ХГ плацентою, а порушення його надходження в сироватку, про що свідчить різке зниження в АР. Таким чином, зворотня динаміка ХГ в АР при с.Дауна та *per inv* (9) може стати підставою в диференційованій діагностиці цих станів.

Виявлена однозначно спрямована зміна МС АФП та ХГ, на наш погляд, не випадкова. Одержані дані та підкреслений в літературі зв'язок *per inv* (9) з репродуктивними порушеннями, спонтанними абортми, збільшення частоти інверсій у пацієнтів з трисомією 21 та їх батьків

[Uchara et al.,1992] свідчать про те, що відношення до цього поліморфного варіанту хромосом повинно бути переглянуто.

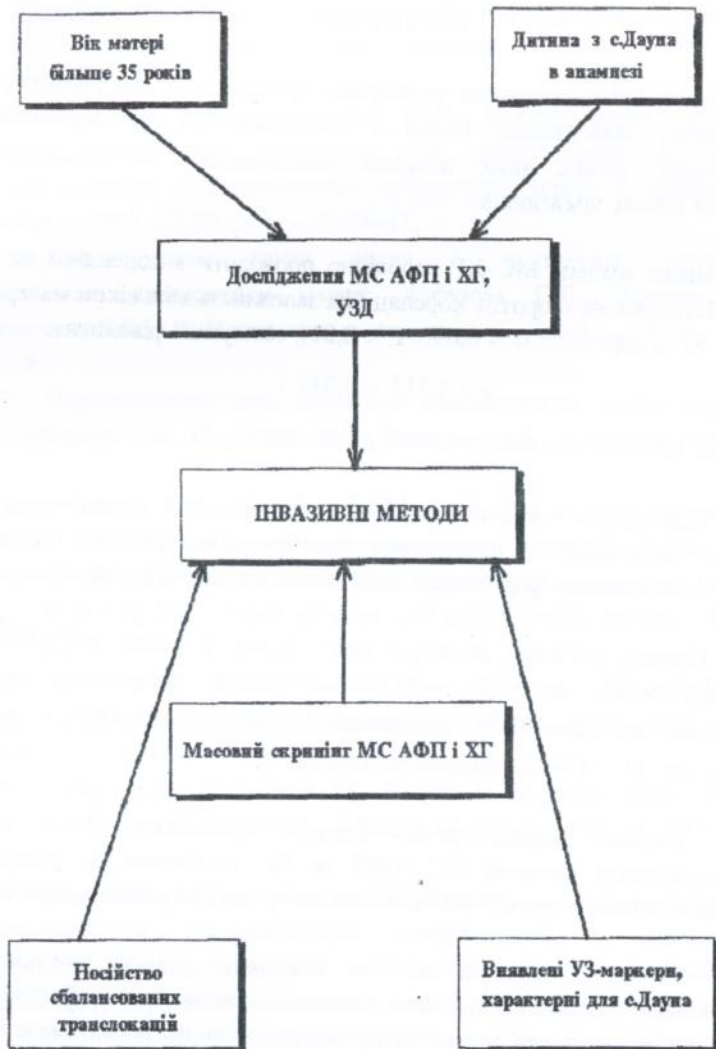
Комплексна пренатальна діагностика с.Дауна на підставі скринінгу маркерів МС.

Результати дослідження показують високу ефективність диференційованого підходу до призначення інвазивних досліджень вагітним віком більше 35 років з урахуванням рівня МС АФП та ХГ. Із 1972 вагітних високого вікового ризику у 1341 жінки (68%) комбінований ризик був нижчий ніж 1:270. Амніоцентез був призначений 631 жінці (32%), у яких ризик перевищував значення 1:270. В цій групі було виявлено 11 плодів з с.Дауна, 61% всіх пренатально діагностованих випадків. Аналіз катамнестичних даних показав, що серед вагітних віком більше 35 років з низьким комбінованим ризиком, яким амніоцентез не призначався, не зареєстровано народження дітей з трисомією 21.

Ефективність диференційованого підходу до призначення інвазивних маніпуляцій вагітним, старших 35 років, а також тим, які мають в анамнезі дитину з с.Дауна, можна проілюструвати наступними даними. В 1991 році група вагітних старшого віку мала найбільшу питому вагу в структурі напрямків на амніоцентез – 44,21%. Хромосомна патологія виявлена у 2,39%. В 1995 році при використанні диференційованого підходу кількість інвазивних маніпуляцій цим жінкам знизилася до 10,32%, при цьому ступінь виявляємості хромосомних захворювань склав 2,34%. Аналогічна картина спостерігається і при аналізі груп жінок, які мали в анамнезі дитину з с.Дауна.

В 1995 році найбільшу кількість інвазивних досліджень виконано вагітним з високим комбінованим ризиком, де відзначено максимальний прояв хромосомної патології – 5,38% у жінок старших 35 років та 3,36% у вагітних до 35 років. Враховуючи наведені дані, найбільш оптимальною являє собою схема формування потоків для інвазивної пренатальної діагностики, яка продемонстрована на мал.3.

Проведення масових досліджень на маркери МС вагітним жінкам та впровадження диференційованого підходу до призначення інвазивних досліджень в групах високого вікового ризику підвищує якість виявлення хромосомної патології.



Мал.3. Схема комплексної пренатальної діагностики с.Дауна

Таким чином, підсумком роботи являється встановлення високої ефективності скринінгу маркерів МС в формуванні груп високого генетичного ризику. Цей вид дослідження може бути рекомендований до обов'язкового масового застосування для попередження широкого спектра патологій плода.

ВИСНОВКИ

1. Високоінформативними маркерами природжених вад розвитку та хромосомних захворювань плода є α -фетопротеїн та хоріонічний гонадотропін, оцінка яких повинна засновуватися на базових та граничних рівнях показників.

2. Аналіз значень МС ХГ необхідно проводити з корекцією на вік жінки. Встановлена зворотня кореляційна залежність між віком матері та вмістом ХГ в сироватці ($r = 0,695$, $P < 0,01$), описувана рівнянням

$$y = 1,215 - 0,048 x,$$

де x – вік вагітної, y – вікозалежний рівень ХГ.

3. Підвищення АФП в сироватці та амніотичній рідині вище 2,5 МоМ в сполученні з позитивним ацетилхолінестеразним тестом є доклінічною ознакою формування ПВР плода з пізньою маніфестацією.

4. Середні значення маркерів при с.Дауна у плода: МС АФП – $0,67 \pm 0,05$ МоМ; МС ХГ – $2,68 \pm 0,47$ МоМ. Оптимальні строки тестування, які дають 60% виявляємості с.Дауна, для АФП – 14–16 тижнів, для ХГ – 17–21 тиждень вагітності.

5. Родинні перицентричні інверсії хромосоми 9 у плода супроводжуються змінами МС АФП та ХГ, подібними до с.Дауна, і являються однією з причин помилковопозитивних результатів скринінгу.

6. Скринінг маркерів МС є важливим етапом комплексної пренатальної діагностики, який дозволяє підвищити ефективність виявлення природжених вад розвитку та хромосомних захворювань плода і диференційовано підійти до призначення інвазивних досліджень.

Список опублікованих наукових робіт, які відображають основні положення дисертації.

1. Арбузова С.Б., Николенко М.И. Использование скрининга факторов материнской сыворотки для пренатальной диагностики пороков развития и хромосомных заболеваний плода // Цитология и генетика. – 1995. – Т.29, N 4. – С. 44–47.
2. Формирование групп риска и проведение инвазивной пренатальной диагностики (соавт. Арбузова С.Б., Хлевная Л.А., Казначеева Е.Б.) // Цитология и генетика. – 1995. – Т.29, N5. – С. 76–81.
3. Гормонодиагностика патологии беременности. (соавт. Арбузова С.Б., Зяблицев С.В., Сорокатыя Э.В., Яковлева Э.Б.) // Донецк, 1995. – 20 с.
4. Arbuzova S.B., Nickolenko M.I. Screening of fetal chromosomal diseases and congenital malformations using maternal serum alpha-fetoprotein /MSAFP/ and chorionic gonadotropin /hCG/ in second trimester // Early fetal diagnosis: recent progress and public health impact. – Prague, 1990. – P.7.
5. Arbuzova S., Nickolenko M. Maternal serum AFP and hCG in diagnostics of fetal chromosomal abnormalities // Eur.J.Hum.Genet. – 1996. – Vol.4, S.1. – P. 157.
6. Arbuzova S., Nickolenko M., Kalinin D. Maternal serum AFP and hCG in diagnostics of trisomy 21 // Brazil.J.Genet. – 1996. –Vol.19, S.2. – P.206.
7. Николенко М.И., Арбузова С.Б. Использование скрининга на α -фетопротеин и хорионический гонадотропин в пренатальной диагностике наследственных заболеваний // Пренатальный и неонатальный скрининг врожденной и наследственной патологии: Тез. докл. Всесоюзной научно-практической конф. – Харьков, 1990. – С.26.
8. Арбузова С.Б., Николенко М.И. Массовая скринирующая программа на α -фетопротеин для выявления патологий плода // Второй Всесоюзный съезд мед. ген.: Тез. докл. – Алма-Ата, 1990. – С. 25–26.
9. Arbuzova S., Nickolenko M. Fetus's inversion of chromosome 9 increases the rate of false-positive maternal serum screening results // PECO-EUCROMIC Congress: Abstract. – Prague, 1996. – P. 79.

10. Arbuzova S., Nickolenko M., Khlevnaya L. Prenatal diagnostics of Down's syndrome in the Donetsk region of the Ukraine // PECO-EUCROMIC Congress: Abstract. – Prague, 1996. – P. 78.

11. Ніколенко М.І., Арбузова С.Б. Деякі особливості змінення рівню АФП та ХГ в сироватці матері при хромосомних порушеннях у плода // II з'їзд мед. генетиків України: Тез. доп. – Львів, 1995. – С.9.

12. Формування потоків для проведення пренатальної діагностики в Донецькому міжбласному медико-генетичному центрі (співавт. Арбузова С.Б., Малова С.А., Хлівна Л.А., Дружиніна О.М.) // II з'їзд мед. генетиків України: Тез. доп. – Львів, 1995. – С. 8.

Ніколенко М.І. Використання скринінгу маркерів материнської сироватки в діагностиці природжених вад розвитку і хромосомної патології плода. Рукопис дисертації на здобуття ученого ступеня кандидата біологічних наук по спеціальності 03.00.15 – генетика (біологічні науки). Український науковий гігієнічний центр. Київ. 1997.

Розроблені базові та граничні рівні АФП і ХГ в сироватці та амніотичній рідині; оптимальні терміни тестування. Встановлена висока ефективність скринінгу маркерів МС в формуванні груп високого генетичного і акушерського ризику. Вивчені фактори, впливаючі на варіації маркерів; причини помилковопозитивних і помилковонегативних результатів; динаміка маркерів при хромосомних захворюваннях; специфічність змін в залежності від типу ПВР, в т.ч. з пізньою маніфестацією. Визначено, що аналіз МС АФП і ХГ дозволяє виявити 60% плодів з с.Дауна. Продемонстрована важлива роль скринінгу маркерів МС в комплексній пренатальній діагностиці ПВР і хромосомних захворювань плода. По темі дисертації опубліковано 12 наукових робіт.

Nickolenko M.I. The use of maternal serum markers screening in diagnosis of fetus's congenital malformations and chromosomal diseases. The manuscript of dissertation for a Candidate's degree in Biology, speciality 03.00.15 – genetics (biological science). Ukrainian Scientific Hygienic Centre. Kiev. 1997.

The basic and ultimate levels of serum and amniotic fluid AFP and hCG; the optimal terms of testing had been elaborated. The high efficiency of MS screening in the formation of high genetic and obstetric groups had been established. The factors influencing the marker's variations; the reasons of false-positive and false-negative results; the marker's levels in chromosomal diseases; the specificity of marker's changes depending on the type of malformations including the malformations with late manifestation had been studied. It is found that MS AFP and hCG analysis allowed to detect 60% of fetuses with Down's syndrome. The important role of MS markers screening in the complex prenatal diagnosis of congenital malformations and chromosomal diseases had been demonstrated. 12 scientific papers within the context of dissertation had been published.

Ключові слова: скринінг; маркери материнської сироватки; пренатальна діагностика; природжені вади розвитку; с.Дауна.

484934

AB 37.025
AB 37.025

Підписано до друку 20.02.97 р. Формат 60x84^{1/16}. Папір фінск.
Лігер. гарнитура. Умовн. друк. арк. 1. Зам. №104. Тираж 100.

Віддруковано на обладнанні ТОВ "Домінанга".