

## Тематический блок № 12

### Диагностика, профилактика и лечение наследственных болезней. Использование методов клинического, параклинического и специального генетического обследования для выявления наследственной патологии.

#### ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:

1. Знать цели, задачи и методы диагностики наследственных болезней. Иметь понятие о периконцепционной профилактики.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ЗНАНИЙ:

1. Знать основные цели и задачи пренатальной диагностики.
2. Знать неинвазивные и инвазивные методы пренатальной диагностики.
3. Знать показания и сущность периконцепционной профилактики.

#### ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ ТЕМЫ:

1. Что такое пренатальная диагностика. Перечислите показания к её проведению.
2. Неинвазивные методы пренатальной диагностики.
3. Инвазивные методы пренатальной диагностики.
4. Периконцепционная профилактика и показания к ней.

#### Методы пренатальной диагностики (ПД).

Методы ПД разделяют на *непрямые* (объектом исследования является беременная женщина) и *прямые* (исследуется сам плод). Последние могут быть **инвазивными** и **неинвазивными**.

#### *Основные методы оценки состояния плода в пренатальной диагностике врожденных наследственных заболеваний*

##### 1. *Непрямые методы* (обследование беременной):

- Акушерско-гинекологические
- Медико-генетические (генеалогические, цитогенетические, молекулярно-биологические)
- Бактериологические, серологические
- Биохимические (скрининг на - фетопротеин, эстриол, хорионический гонадотропин и др.)

##### 2. *Прямые методы*:

- **Неинвазивные** (ультразвуковое сканирование, электрокардиография, рентгенография и др.)
- **Инвазивные**
  - ✓ Хорионбиопсия (8—10 недели беременности)
    - трансвагинальная
    - тринсабдоминальная
  - ✓ Плацентоцентез (II-й триместр беременности)
  - ✓ Амниоцентез (ранний — I-й триместр. 12—14 неделя беременности: общепринятый — II-й триместр. 18—20 неделя беременности.)
  - ✓ Кордоцентез — II-й триместр, 20—24 неделя беременности
  - ✓ Фетоскопия
  - ✓ Биопсии тканей плода (печень, селезенка, кожа, мышцы и др.).



Схема 1. Методы пренатальной диагностики.<sup>21</sup>

<sup>21</sup>Основы пренатальной диагностики / Под ред. Юдиной Е.В., Медведева М.В. М.: РАВУЗДПГ, Реальное Время, 2002

### **1. Непрямые методы.**

Для оценки состояния плода применяют биохимические методы (анализ крови и мочи беременной), ультразвуковое исследование (УЗИ). Особую роль играет акушерско-гинекологический анамнез. Обязательным для женщин группы риска является медико-генетическое консультирование, дополненное при необходимости результатами бактериологического, иммунологического и эндокринологического обследования.

Обязательными методами дородовой диагностики в программе скрининга являются: биохимические исследования маркерных сывороточных белков крови женщины, УЗИ-сканирование. Данные исследования позволяют определить наличие у плода хромосомных болезней и пороков развития.

#### **Биохимический скрининг.**

К маркерным соединениям в крови матери относятся - фетопротеин (АФП), хорионический гонадотропин (ХГ), свободный (неконъюгированный) эстриол (НЭ), РАРР -А, другие. Показатели биохимического скрининга, а также другие параметры (например, ультразвуковые маркеры хромосомных болезней), можно ввести в программу статистического анализа степени риска хромосомных нарушений у плода. Показанием для использования инвазивной ПД с целью кариотипирования плода считается риск выше, чем 1:250 (от 1:190 до 1:400 в разных странах) на момент рождения ребенка. Биохимический скрининг позволяет осуществить отбор беременных в группу риска по рождению детей с хромосомными аномалиями. Таким беременным необходима инвазивная ПД с целью кариотипирования плода.

Стоит отметить, что положительные результаты скрининга — только сигнал к более глубокому обследованию данной пациентки, так как хромосомная мутация будет выявлена у 1:50 беременных этой группы.

Последние 5 лет исследователи многих стран заняты поиском сывороточных маркеров в крови беременных, которые позволяли бы формировать группу риска рождения детей с болезнью Дауна уже в первом триместре беременности. Важную роль играет показатель свободной бета-субъединицы хорионического гонадотропина и ассоциированный с беременностью белок А (pregnancy associated plasma protein A) - PAPP-A, который оценивается в первом триместре беременности. Маркером УЗИ является толщина воротникового пространства (ТВП) на сроке беременности 10—14 недель. Если рассчитать совокупный риск по измерению ТВП и биохимическим маркерам, то эффективность выявления БД у плода может достигать 80—90%.

## ***2. Прямые методы пренатальной диагностики.***

Основным прямым неинвазивным методом является метод УЗ-сканирования. Значение этого метода в связи с его высокой эффективностью выявления врожденных пороков, безвредностью для плода и матери трудно переоценить.

### **Неинвазивные методы.**

#### **УЗ-сканирование плода (УЗ-диагностика).**

Одним из главных методов ПД является исследование состояния плода с помощью ультразвукового аппарата. УЗ исследование позволяет выявить 80—98% плодов с анатомическими пороками и в настоящее время широко используется в нашей стране для скрининга патологии беременности. Метод особенно информативен на сроке 18—20 недель беременности. В первые 3 месяца УЗИ показывает, живой ли плод, какого он возраста и сколько развивается плодов. Начиная со второго триместра беременности УЗИ позволяет выявить грубые врожденные пороки строения тела, определить прилежание плаценты и объем амниотической жидкости. Пол плода обычно можно определить после 20 недель беременности.

Однако, необходимо помнить, что ни один анализ или исследование не дает 100%-ую точность и гарантию. А значит и нормальный результат УЗИ не гарантирует рождение здорового ребенка. На практике необходимо использовать комплексный подход.

#### **Инвазивные методы пренатальной диагностики.**

Инвазивные методами ПД включают внутриматочные вмешательства при УЗ-мониторинге в операционных условиях. Полученный плодный материал подвергается гистологическому, биохимическому, цитогенетическому или молекулярному анализам.

В настоящее время имеется возможность диагностики еще в доимплантационный период ряда моногенных болезней (муковисцедоз, фенилкетонурия, миодистрофия Дюшена, гемофилии). Для диагностики может быть использован следующий материал: полярные тельца или отдельные бластомеры доимплантационного зародыша, полученные микрохирургическим путем в случае ЭКО. Широко используются методы исследования или диагностики генетических аномалий у плода, определение содержания маркеров (например, альфа-фетопротеина) в крови беременной, амниоцентез, исследование ворсин хориона и взятие пуповинной крови через кожу.

#### **Содержание альфа-фетопротеина.**

Определение содержания альфа-фетопротеина в крови беременной женщины служит основным методом предварительной пренатальной диагностики (скрининг-тестом), поскольку его высокий уровень указывает на повышенную вероятность рождения ребенка с расщелиной позвоночника, анэнцефалией или другими аномалиями. Повышение альфа-фетопротеина может являться показателем того, что во время взятия крови на анализ

продолжительность беременности была установлена неточно, что развивается несколько плодов, что вероятен самопроизвольный аборт (угрожающий аборт) или что плод погиб.

Этот анализ не выявляет от 10 до 15% плодов, имеющих дефекты спинного мозга. Наиболее точные результаты могут быть получены, когда исследование крови производится между 16-й и 18-й неделями беременности; исследование до 14-й или после 21-й недели не дает точных результатов. Иногда анализ повторяют через 7 дней после первого анализа крови.

Ультразвуковое исследование проводится с целью обнаружения аномалий развития, если определено высокое содержание альфа-фетопротеина. Приблизительно у 2% обследуемых женщин УЗИ не выявляет причину высокого уровня альфа-фетопротеина. В этих случаях обычно выполняют амниоцентез, чтобы определить концентрацию альфа-фетопротеина в амниотической жидкости, которая окружает плод. Данный способ более эффективен для обнаружения дефектов нервной трубки, чем измерение содержания альфа-фетопротеина в крови женщины. Однако во время амниоцентеза в амниотическую жидкость может попадать кровь плода, вызывая ложное повышение уровня альфа-фетопротеина. Обнаружение фермента ацетилхолинэстеразы в амниотической жидкости помогает подтвердить диагноз. Высокий уровень альфа-фетопротеина обнаруживается во всех случаях анэнцефалии и в 90–95% случаев расщелины позвоночника, в амниотической жидкости при этом может быть обнаружена ацетилхолинэстераза. Приблизительно в 5-10% случаев расщелину позвоночника не удается обнаружить при амниоцентезе, поскольку отверстие в спинномозговом канале закрыто кожей, из-за чего альфа-фетопротеин не может попасть в амниотическую жидкость.

Повышение содержания альфа-фетопротеина в амниотической жидкости может сопровождать множество аномалий, в сочетании с выявлением ацетилхолинэстеразы. В частности, это сужение выходного отдела желудка (пилорический стеноз) и дефекты брюшной стенки, например эмбриональная грыжа. Хотя УЗИ с высоким разрешением часто позволяет выявлять эти аномалии, но даже при нормальных показателях нет уверенности в отсутствии заболевания. Чаще возникают осложнения во время беременности, если у матери обнаруживается высокое содержание альфа-фетопротеина в крови, например задержка развития, смерть плода или преждевременная отслойка плаценты.

Низкое содержание в крови женщины альфа-фетопротеина, как правило, в сочетании с высоким содержанием хорионического гонадотропина и низким – эстриола указывают на возможность другой группы аномалий, в том числе синдрома Дауна. Врач может оценить вероятность развития синдрома Дауна у плода, учитывая содержание этих гормонов (маркеров) в крови пациентки. Также учитывается возраст женщины. Патологическое содержание данных маркеров может также указывать на неправильное определение срока беременности или гибель плода.

Если УЗИ не позволяет установить причину изменения содержания маркера в крови, требуются другие методы обнаружения хромосомных заболеваний, такие как амниоцентез и хромосомный анализ.

#### **Амниоцентез.**

Распространенным методом ранней диагностики врожденных аномалий является **амниоцентез**; его лучше всего проводить между 15-й и 17-й неделями беременности.

Во время процедуры состояние плода контролируется с помощью ультразвука. Врач обращает внимание на сокращения сердца, возраст плода, положение плаценты, локализацию амниотической жидкости и определяет, не является ли беременность многоплодной. Затем под УЗ-контролем вводит иглу через брюшную стенку в амниотическую жидкость (рис.18). Жидкость отсасывается для анализа, и игла удаляется.

Результаты обычно готовы через 1-3 недели. Женщины, имеющие резус-отрицательную кровь, после процедуры получают Rh0-(D)-иммуноглобулин, для предотвращения выработки антител.

Амниоцентез почти не опасен для женщины и плода. Кратковременные выделения из влагалища или подтекания амниотической жидкости встречаются приблизительно у 1-2% женщин и обычно прекращаются без лечения. Вероятность самопроизвольного аборта после амниоцентеза составляет приблизительно 0,5%, хотя некоторые исследования показали, что риск еще ниже. Повреждения плода иглой чрезвычайно редки. Амниоцентез проводится также и в случае многоплодной беременности.



Рис.18. Амниоцентез.<sup>1</sup>

#### **Анализ ворсин хориона (хорионобиопсия).**

Исследование ворсин хориона, применяемое для диагностики некоторых аномалий у плода, обычно проводится между 10-й и 12-й неделями беременности. Это исследование может использоваться вместо амниоцентеза, если для диагностики не требуется амниотическая жидкость, как, например, при определении содержания альфа-фетопротеина в амниотической жидкости. Перед процедурой проводится ультразвуковое исследование (УЗИ), чтобы убедиться, что плод жив, подтвердить возраст плода и определить расположение плаценты.

Исследование ворсинок хориона результативно при более ранних сроках беременности. В этом случае прерывания беременности может стать своевременным и более безопасным. Если аномалии не обнаружены, тревогу будущих родителей можно уменьшить раньше. Ранняя диагностика заболевания также необходима для адекватного лечения плода еще перед рождением. Например, назначение терапии кортикостероидами беременной женщине может предотвратить развитие мужских признаков у плода-девочки с врожденной гиперплазией надпочечников, при котором надпочечники увеличены и вырабатывают чрезмерное количество андрогенов (мужских половых гормонов).

В случае резус-конфликта, при обнаружении в крови матери антител к резус-положительной крови плода, исследование ворсин хориона не делается, поскольку это может ухудшить состояние. Вместо этого исследования между 15-й и 17-й неделями может быть проведен амниоцентез.

Для получения ворсин хориона (крошечных отростков, которые составляют часть плаценты) материал получают через половые каналы или брюшную стенку матери. Под ультразвуковым контролем врач вводит катетер (гибкую трубку) через влагалище и шейку матки в плаценту. Небольшая часть ткани плаценты отсасывается в катетер с помощью

<sup>1</sup> Акушерство: национальное руководство / под ред. Э.К. Айламазяна, В.И. Кулакова, В.Е. Радзинского, Г.М. Савельевой. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. - 1200 с. - (Серия "Национальные руководства")

шприца (рис.19). Трансцервикальный метод не может использоваться, если у женщины обнаружены гинекологические заболевания или инфекции половых органов (герпес, гонорея). Трансабдоминальный метод проводится под местной анестезией; игла вводится через брюшную стенку в плаценту, и ее ткань отсасывается шприцем. Ни один из методов не вызывает боли. Полученную ткань исследуют в лаборатории.

Опасность осложнений при исследовании ворсин хориона сопоставима с таковой при амниоцентезе; лишь риск повреждения кистей рук и стоп плода может быть несколько выше (1 из 3000 случаев). Если диагноз неясен, необходимо провести также амниоцентез.

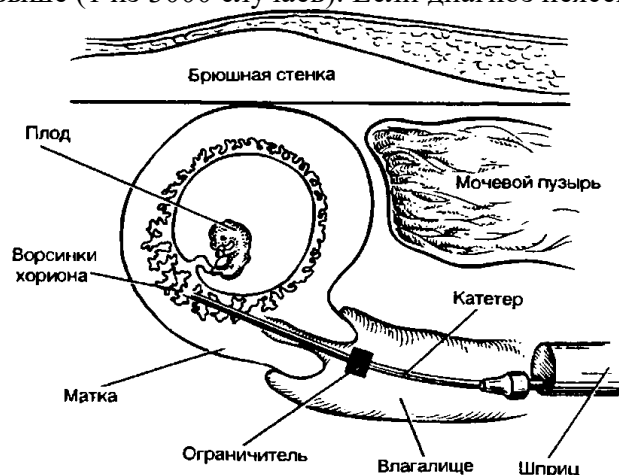


Рис.19. Хорионобиопсия.<sup>2</sup>

#### **Взятие пуповинной крови через кожу (кордоцентез) (рис.20).**

Кордоцентез (взятие пуповинной крови через кожу) проводится для срочного хромосомного анализа, особенно когда к концу беременности УЗИ показало аномалию у плода. Обычно результаты получают в течение 48 часов.

При проведении амниоцентеза врач под контролем ультразвука вводит иглу через брюшную стенку в амниотическую жидкость. Образец жидкости берется для исследования. Эту процедуру лучше всего проводить между 15-й и 17-й неделями беременности.

Для исследования ворсин хориона одним из двух методов берут для исследования ворсины хориона, являющегося частью плаценты. Отличается принцип взятия материала:

1. Трансцервикальный метод – введение катетера через влагалище и канал шейки матки.
2. Трансабдоминальный метод – введение иглы в плаценту через брюшную стенку.

Сходство данных методов:

1. УЗ-контроль,
2. взятие материала осуществляется шприцем.

Исследование ворсин хориона обычно производится между 10-й и 12-й неделями беременности.

<sup>2</sup> Акушерство: национальное руководство / под ред. Э.К. Айламазяна, В.И. Кулакова, В.Е. Радзинского, Г.М. Савельевой. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007.- 1200 с. - (Серия "Национальные руководства")

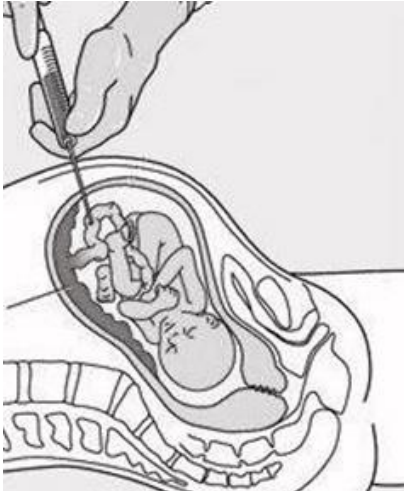


Рис.20. Кордоцентез.<sup>3</sup>

### **Перспективные направления пренатальной диагностики.**

В настоящее время разрабатывается и внедряется преимплантационная диагностика.

Два основных подхода к преимплантационной диагностике:

1. Периконцепционный генетический анализ, основанный на биопсии гамет.
2. Преимплантационная диагностика, основанная на биопсии бластомеров.

### **ДНК-диагностика наследственных заболеваний.**

Определение генетического маркера, связанного с локусом конкретного гена можно использовать для прогнозирования наследования плодом аномального гена. Методы изучения ДНК являются еще одним аспектом генетики, используемым в ПД.

Современные методы молекулярной генетики позволяют изучать практически любой фрагмент ДНК человека. Когда известно, какое повреждение ДНК приводит к наследственному заболеванию, используется именно поврежденный фрагмент ДНК. Такие методы ДНК-диагностики называются прямыми. Существует и более сложный подход, при котором проводят анализ ДНК в окрестности гена, ответственного за заболевание, так же и семейный анализ. В любом случае необходимым условием проведения ДНК-диагностики является картирование генов – описание расположения изученных ДНК-маркеров. В настоящее время картировано свыше 3500 анонимных фрагментов ДНК и почти 2500 маркеров генов, около 400 из этих генов определяют наследственные заболевания.

*Таблица 4. Методы пренатальной диагностики и связанные с ними риски.<sup>4</sup>*

---

<sup>3</sup> 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.

<sup>4</sup> Баранов В.С., Кузнецова Т.В., Баранов А.Н., Швед Н.Ю. Пренатальная диагностика хромосомных болезней у плода / Методические рекомендации, - СПб.: МЗ МП РФ, 1995.

Срок беременности	Оптимальное время	Риск выкидыша	Доступность
<b>Преимплантационный период</b>			
Биопсия эмбриона	6–10-клеточная стадия	Не определен, метод считают безопасным	Ограниченная
<b>I триместр (0–13 недель)</b>			
Биопсия ворсин хориона:			
транспервикальная	9–12 недель	0,5–2,0%	Специализированное оборудование
трансабдоминальная	9–13 недель	0,5–2,0%	
Материнский кровоток	С 6-й недели	Безопасен	Специализированное оборудование
<b>II триместр (14–26 недель)</b>			
Трансабдоминальная биопсия плаценты	14–40 недель	0,5–2,0%	Специализированное оборудование
УЗИ	16–18 недель	Безопасен	Широко применяют
Амниоцентез	16–18 недель	0,5%	Широко применяют
Кордоцентез	18–40 недель	1%	Специализированное оборудование
Фетоскопия	18–20 недель	3%	Широко применяют
Биопсия тканей плода	18–20 недель	3%	Узко специализированное оборудование

## 1. Периконцепционная профилактика.

За 3-4 месяца до зачатия супруги должны убедиться в состоянии своего генетического, соматического и репродуктивного здоровья, пройти необходимое обследование с целью выявления и санации очагов соматической, гинекологической, урологической патологии, половых инфекций, нормализации менструального цикла и гормонального фона.

За 2-3 месяца до планируемого зачатия супруги проходят профилактическое лечение с применением комплекса витаминов и микроэлементов (с обязательным содержанием фолиевой кислоты, до 3 мг в сутки), что активизирует и нормализует клеточный метаболизм. При наступлении беременности супруга продолжает прием витаминов в течение первого триместра, наблюдается в женской консультации или МГК и проходит обследование по программе пренатальной диагностики.

Показания для периконцепционной профилактики:

- наличие риска в семье по ВПР
- имеющиеся ранее выкидыши, мертворождения, anomalies плода
- эндокринопатии
- хроническая соматическая патология у одного из супругов
- работа на производстве с повышенным уровнем вредности.

## 2. Преимплантационная диагностика.

ПГД — метод диагностики изолированных генных и хромосомных дефектов у ооцитов и эмбрионов, а также определение пола эмбриона для предупреждения сцепленных с полом наследственных заболеваний. Преимплантационная диагностика базируется на методе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), цель которого — получение эмбрионов на ранних стадиях преимплантационного развития (рис.21).



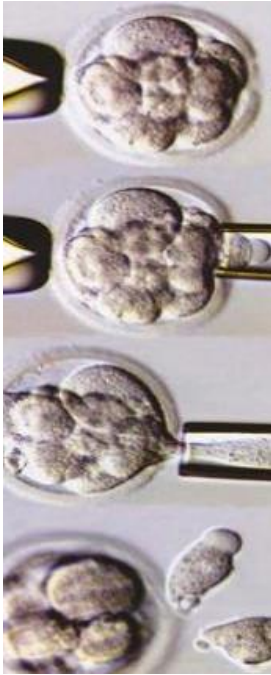


Рис. 21. Забор бластомеров на стадии морулы.<sup>5</sup>

Применение методов преимплантационной диагностики целесообразно для людей, относящихся к группе риска по рождению детей с наследственными заболеваниями. Главное преимущество преимплантационной диагностики — отказ от инвазивных вмешательств на плодном яйце и прерывание беременности в случае выявления патологии. Материалом для исследования служат полярные тельца ооцитов (женская патология) и/или бластомеры эмбриона (патология зародыша). Используются методы флюоресцентной гибридизации (ФИШ/FISH) или полимеразной цепной реакции (ПЦР/PCR).

Наследственные заболевания и врожденные пороки развития занимают 2—3-е место среди всех причин перинатальной смертности. Хромосомная патология — одна из самых распространенных среди генетических нарушений. Она способна приводить к множественным порокам развития, летальному исходу в 1 год жизни, или к задержке его психофизического и умственного развития, значительным нарушениям в эндокринной и иммунной системах. На сегодняшний день актуальной проблемой общества и современной медицины является своевременная диагностика и профилактика врожденных и наследственных заболеваний.

ПГД проводится в период раннего эмбриогенеза *in vitro*. Основные этапы ПГД:

1. Взятие материала - биопсия бластомеров.
2. Лабораторное проведение гибридизации *in situ*.
3. Идентификация хромосом в отдельных ядрах (микроскопирование)

ПГД помогает избежать хромосомных заболеваний, сцепленных с полом плода (гемофилии А и В, миопатии Дюшенна, синдрома Мартина — Белла и др.), трисомии по 21-й хромосоме (синдром Дауна), 13-й хромосоме (синдром Патау), 18-й хромосоме (синдром Эдвардса), моносомии (синдром Шерешевского — Тернера) и др. С каждым годом увеличивается перечень заболеваний, которые можно определить методом ПГД. С помощью ПГД, используя технику ПЦР, диагностируются заболевания с доминантным и рецессивным типом наследования мутантного гена.

Если у родителей в кариотипе имеется хромосомная транслокация, эта диагностика позволяет исключить наличие патологии, но не исключает наличие данной мутации

<sup>5</sup> Медицинская лабораторная диагностика, программы и алгоритмы. Под ред. проф. Карпищенко А.И., СПб, Интермедика, 2001

(сбалансированной транслокации) у эмбриона. Ответить на него может только последующая пренатальная диагностика.

Перенос эмбрионов со сбалансированным кариотипом в программе экстракорпорального оплодотворения:

1. исключает рождение детей с хромосомной аномалией,
2. определяет нормальное течение беременности,
3. способствует своевременным родам

Многие центры ЭКО во всем мире используют ПГД с помощью FISH-метода с целью скрининга эмбрионов для выявления анеуплоидии.

Преимущества FISH-метода:

- для генетического исследования этим методом не требуется получение большого количества биологического материала, а также выделение ДНК из клеток,
- возможность анализа хромосом на всех стадиях клеточного цикла (а не только в метафазе), в том числе в интерфазе,
- оперативность метода (позволяет быстро получить результаты),
- короткое время получения результатов в тех случаях, когда клетки различного биологического материала плохо культивируются *in vitro* либо, когда их мало.

Исследуя бластомеры эмбрионов, E. Scottetal (1998) отметили, что если возраст матери превышает 35 лет, риск появления хромосомных патологий плода значительно возрастает. Частота анеуплоидий по хромосомам X, Y, 13, 18, 21 гораздо выше у преимплантационных эмбрионов, чем в абортном материале, или у плодов при проведении пренатальной диагностики. При ЭКО и ПЭ перенос эмбрионов без данных аномалий женщинам старше 35 лет, увеличивает вероятность беременности.