

ПРЕНАТАЛНА ДИАГНОСТИКА – ОСНОВЕН ПОДХОД ЗА ГЕНЕТИЧНА ПРОФИЛАКТИКА

Мари Хачмериян, Людмила Ангелова

Катедра по медицинска генетика, Медицински университет – Варна

PRENATAL DIAGNOSIS - BASIC GENETIC APPROACH TO PROPHYLAXIS

Mari Hachmeriyan, Lyudmila Angelova

Department of Medical Genetics, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Профилактиката, като икономически и медико-социално най-ефективен метод за превенция, следва да бъде приоритет на всяка медицинска специалност. В ерата на фулминантно развиващи се технологии медицинската генетика разполага с все повече средства за борба с тежките вродени заболявания. В статията са представени същността и основните елементи при провеждането на неинвазивни и инвазивни методи за пренатална генетична профилактика. Биохимичният скрининг и новите тестове за анализ на свободна фетална ДНК, както и последващите диагностични анализи, имат освен съответните възможности, така и определени ограничения. Представени са индикациите за провеждане, както и условията за избор на поведение в съответствие с морално-етичните и правни норми. Динамиката в развитието на областта е огромна и само времето ще утвърди или отхвърли различните подходи за пренатална диагностика.

Ключови думи: профилактика, пренатална диагностика

Профилактиката на наследствените болести следва да бъде приоритет на всяка здравеопазна система не само защото е икономически и медико-социално най-ефективна, но и единствен метод за борба с тежки генетични заболявания, за които няма възможност за лечение, водят до тежка инвалидизация и често се асоциират с умствено изоставане.

Днес приоритет е търсенето на чувствителни, специфични, валидирани и икономически из-

ABSTRACT

Prophylaxis, as economicaly and socially most effective method of prevention, should be priority of all medical specialties. In the era of emerging technologies, medical genetics has more tools to fight serious congenital diseases. The article presents key moments and principle elements in providing non-invasive and invasive methods as prenatal genetic prevention. Maternal biochemical screening and the new non-invasive prenatal genetic tests as well as prenatal diagnostic tests have their possibilities and limitations. Indications for providing prenatal diagnosis together with moral, ethical and legal standards are listed. There is huge dynamics in development of the field so only time will approbated or reject various approaches to prenatal diagnosis.

Keywords: *prophylaxis, prenatal diagnosis*

годни методи за диагностика, заместващи оценката на риска от скрининговите подходи.

Това обаче трябва да бъде преценено, също както всички останали лабораторни данни, през призмата на цялостния контекст и конкретния случай. Главната отправна точка за изграждане на поведение при генетично заболяване, подлежащо на пренатална диагностика, остава желанието на родителите, взето на основата на добра информираност.

Подходът при обсъждане на рискова бременност трябва да бъде проспективен, нефорсиран от срокове или състояние на необективност при вече реализирана бременност.

В случай на налична бременност въпросите, на които трябва да отговорим за извършване на пренатална диагностика след недвусмислено заявено желанието на родителите, са:

До колко тежко е заболяването и предполага ли то прекъсване на бременността?

- Без съмнение тестването за тежки малформативни синдроми, несъвместими с живота, е очевидно необходимо, но други състояния с малки аномалии със или без умствено изоставане, заболявания, протичащи с вариабилна тежест или имат много късно начало, могат да създадат трудности при консултирането на родителите.

Има ли лечение и доколко ефективно е то?

- Лекуваната фенилкетонурия с диета впоследствие води до напълно нормален живот, докато при пациент с галактоземия бъдещето не е толкова ясно; съвременно приложение по клинични проучвания за редица нелечими заболявания може да намери утвърдено място в практиката.

До каква степен партньорите са решени да прекратят бременността при налични показания?

- Съществуват различни както персонални, така и етични, религиозни и правни норми, които трябва да бъдат обсъдени с родителите обстойно.

До колко точен е методът, използван за пренатална диагностика?

- Напредъкът в молекулярните анализи е явен, но не винаги напълно ясен. Тънка е границата между научните открития и наложените в практиката тестове – валидирани и утвърдени, особено при редки заболявания, където гените и мутациите, свързани с конкретно заболяване, са скоро открити и не напълно изяснени. Пренаталният тест трябва да бъде достатъчно сигурен, за да позволи взимането на адекватни решения.

Има ли значителен генетичен риск за плода?

- Като висок генетичен риск се определя този над 10%, среден – между 5-10%, и нисък – под 5%. За да се проведе пренатална диагностика, е необходимо рискът от усложнение (аборт, инфекция и др.), предизвикан от съответната манипулация, да бъде по-малък от този, да се роди засегнат плод (6).

Показания за насочване към пренатална диагностика

- Повишен генетичен риск.
- **Майчината възраст** - водеща причина за провеждане на пренатална диагностика поради ексоненциално нарастващия риск за раждане на дете със синдром на Даун. За гранична възраст се приема 35 г. (защото тогава рискът от загуба на плода вследствие манипулацията е съизмерим с този да се роди дете с хромозомна болест 1/250).
- Наличие на предходяща бременност с **хромозомна болест** възникнала de novo. Въпреки че случаят е бил спорадичен, се смята, че рискът се повишава с 1-2% при жена под 35 години. При жена над 35 рискът за следваща бременност е в зависимост от възрастовия риск.
- Наличие на **балансирано хромозомно преустройство** при един от родителите. Например в случай на Робертсонова транслокация, включваща 14 и 21 хромозома, разкрита у майката, рискът за поколението е 15%. Рисковете зависят от вида на преустройството, ангажирания хромозомен сегмент, пола на родителя носител и др.
- Наличие на **фамилно генетично заболяване или носителски статус**, което може да бъде доказано чрез биохимични или ДНК тестове. Индикациите са родено дете, болен родител или положителна фамилна анамнеза. Рисковете при моногенните заболявания са високи 25-50%. Изключително важно е тук да се акцентира, че видът на конкретната мутация при моногенното заболяване трябва да е уточнен преди срока за инвазивната манипулация, най-добре преди новото репродуктивно решение.
- **Аномалии, разкрити в хода на бременността** – патологични данни от феталната анатомия, повишен риск от биохимичен скрининг, от кръвнородствен брак, изоставане във вътреутробното развитие и др.
- **Фамилна история** за вродени аномалии – изисква се провеждане на високорезолютивна фетална морфология (16-18 г.с.) за насочено търсене на аномалии в плода в съчетание с медикогенетична консултация.

МЕТОДИ

Съществуват различни методи за осъществяване на пренатална диагностика. При предлагане на семейството на някой от тях е необходимо да се преценят рисковете, ползите, както и

възможностите на процедурата. Това са високо специфични манипулации, които следва да бъдат извършвани от опитен и обучен персонал, отговарящ на изисквания по Национален стандарт (3). Всяка от инвазивните манипулациите се извършва в строго определен период на бременността, в стерилна обстановка с цел създаване на тъканна култура от биологичния материал и назначаване на съответния анализ. Предварително се провежда медико-генетична консултация и информиране на двойката по отношение различните методи за генетично изследване и се подписва информирано съгласие.

Медико-генетичната консултация за провеждане на пренатална диагностика е свързана със следните основни правила:

- Ясно диференциране между предлаган скринингов и диагностичен метод за пренатална профилактика (Табл. 1).

скрининг се предлага диагностично изследване (генетично, УЗ).

Скринингът на бременни жени представлява най-широко прилаганият в момента подход за генетична профилактика на бройни хромозомни аномалии. Провеждат се комбиниран ранен скрининг в 11-13⁺⁶ г.с., базиран на УЗ маркери (нухална транслуценция, наличието на носни костици), измерени от висококвалифициран специалист акушер-гинеколог или образен диагностик, в комбинация с кръвните показатели – свободен човешки хорионгонадотропин (free b-hCG), плацентарен антиген (PPAP-A), майчина възраст и тегло на бременната. Късният биохимичен скрининг, провеждан в 14⁺⁴-20⁺ се базира на изследване на алфа-фетопротеин (AFP), неконюгиран естриол (uE3), свободен човешки хорионгонадотропин free b-hCG (или общ hCG), майчина възраст и тегло. Най-висока чувстви-

Табл. 1. Основни групи методи за пренатална генетична профилактика

Неинвазивни методи	Инвазивни методи
Майчин биохимичен серумен скрининг в първи и втори триместър	Предимплантационна/предконцепционна диагностика
Фетална анатомия/морфология чрез ултразвук	Хорионбиопсия
Изолиране на фетални клетки от майчината циркулация с генетичен анализ	Амниоцентеза
	Кордоцентеза

- Адекватна оценка на фамилната анамнеза и необходимостта от провеждане на съответен анализ.
- Оценка на рисковете за плода, поясняване хода на заболяването, степен на тежест, възможност за лечение, на възможностите и ограниченията на генетичния анализ.
- Възможност за получаване на недефинитивни резултати и трудности при интерпретацията на резултата.

НЕИНВАЗИВНИ МЕТОДИ

Майчин серумен скрининг в първи и втори триместър

На всички бременни трябва да бъде подробно разяснена възможността на скрининга да оценява риск, без това да е дефинитивна диагноза. При скрининговите методи са допустими около 5% фалшиво положителни резултати (според възрастовата категория), както и фалшиво отрицателни резултати. Чувствителността на генетичния тест се определя от подхода (модела) на прилагания скрининг – последователен, контингентен или интегриран (4). При повишен риск от

телност на генетичния тест (над 90%) с минимум фалшиво отрицателни резултати се постига при комбиниране на риска от двата скрининга чрез т.нар. последователен подход с интегрирана оценка на риска.

Феталната анатомия / морфология (пренатална ултразвукова диагностика) представлява високоспециализиран ултразвуков преглед от квалифициран специалист в областта. Като пренатален диагностичен метод той има за цел разкриване на единични или множествени аномалии, поради което се разграничава от стандартния акушерски ултразвуков преглед. Извършва се 11-13 г.с., 19-22 г.с. и за т.нар. „аномалии с късно начало“ 30-32 г.с. Освен опитен специалист необходимо условие за извършване на анализа е наличието на високотехнологична апаратура (8).

Тестване на свободна фетална ДНК е неинвазивен иновативен метод за изследване на свободно циркулираща фетална ДНК в майчината кръв след 9 г.с. Най-често се използва при семейства, които не желаят да приемат риска от инвазивна манипулация. Налични на пазара са тестове за най-често срещаните анеуплоидии (13,

18, 21, X, Y). Въпреки високата им чувствителност над 99% за синдром на Даун и малко по-ниска за другите автозомни анеуплоидии, тези тестове по своята същност на този етап са скринингови и изискват при разкрита патология потвърждение с инвазивен метод (3). Предимствата му, поради които в последно време силно нараства приложението му на българския пазар, са неговата неинвазивност, висока чувствителност, минимален процент фалшиво положителни и фалшиво отрицателни резултати. Недостатъците са свързани с нисък добив от фетални клетки, все още ниска чувствителност за хромозомни болести по половите хромозоми, висока цена. Въпреки че е икономически неизгоден за масово приложение, се очаква с внедряването на новите технологии и конкуренция на пазара цената да спадне драстично.

Анализът се извършва, когато е налице една от следните индикации:

- напреднала възраст;
- аномални УЗ данни за тризомия 13, 18, 21;
- аномални серумни маркери за тризомия 13, 18, 21;
- тризомия 13, 18 или 21 в семейната анамнеза или в предходна бременност;
- други медицински причини (съвместно решение на лекар и пациент) (5).

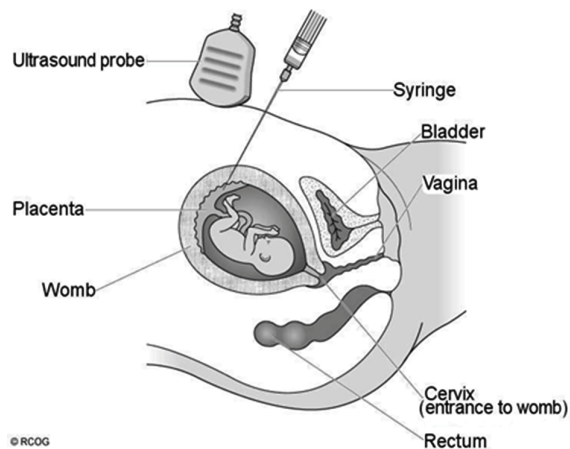
ИНВАЗИВНИ МЕТОДИ

Предимплантационната / предконцепционна генетична диагностика и скрининг представляват ранни методи (някои от тях достъпни и у нас) за откриване на редица генетични аномалии в ембриона, преди той да се имплантира в матката, като по този начин се избягва прилагането на медицински аборт, ако ембрионът е засегнат. Намира приложение при семейства, нуждаещи се от *in vitro* фертилизация. Диагностика на генетични аномалии на този етап е трудна, тъй като са достъпни за анализ единични клетки. Ембрионите могат да бъдат изследвани за хромозомни, моногенни и митохондриални заболявания.

Осъществява се чрез изследване на бластомер след биопсия на ембриона на 3-ия ден след оплождането или биопсия на трофоектодерм, много по-рядко в I-о и II-о полярно телце. На този биологичен материал може да се направи PGS (предимплантационен генетичен скрининг) за хромозомни анеуплоидии и PGD (предимплантационна генетична диагностика) при родител, носител на генна или хромозомна мутация. Прилагат се различни генетични техники като FISH флуоресцентна *in situ* хибридизация (с минимално приложение днес), aCGH (сравнителна ге-

номна хибридизация), както и молекулярно-генетични анализи върху намножена ДНК, изолирана от бластомер или трофобласт.

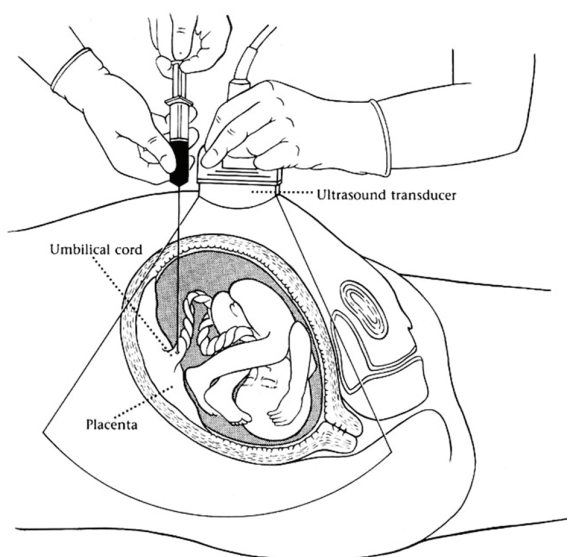
Хорионбиопсия се извършва в първи триместър (11-12 г.с.) и във времето се е наложила като най-ранния метод за провеждане на генетичен анализ при семейства, които не се нуждаят от асистирана репродукция. При моногенни нарушения с висок риск за плода (25%, 50%) е препоръчително извършването ѝ пред амниоцентеза. Възможен е трансцервикален и трансабдоминален достъп под ехографски контрол за аспириране на 5-10 мг въси от външния трофобластен слой. Микроскопски се отделя майчината от феталната тъкан и материалът може да послужи за молекулярен, ензимен и/или хромозомен анализ. Диагностика е сравнително бърза. Рискът от манипулацията е малко по-висок (1-2%), в сравнение с този при амниоцентеза (<1%), но несъизмеримо по-малък от риска при моногенните нарушения (Фиг. 1).



Фиг. 1. Манипулация хорионбиопсия а) трансабдоминална и б) трансцервикална (1)

Амниоцентезата е най-старият метод за пренатална диагностика (използван още за доказване на пола) (16-19 г.с.), предпочитан и у нас. Опитът на Лабораторията по медицинска и молекулярна генетика във Варна стартира в края на 2006 г., като материалът се получаваше след манипулация, извършвана в МЦ "Майчин дом" (2). Тази широко разпространена техника е особено предпочитана при бременности с нисък риск и съмнение за хромозомна патология, както и е единствено възможна при метаболитни нарушения с неясна патогенеза.

Амниотичната течност се взема в количество около 15-18 мл, трансабдоминално, като първите няколко милилитра се отстраняват, за да се намали рискът от майчина контаминация. Резул-



Wendolyn Hill

Фиг. 2. Манипулация а) амниоцентеза и б) кордоцентеза (1)

татите могат да се забавят до 3 седмици след извършване на манипулацията според вида на анализа, което е важно да бъде съобщено на двойката. Рискът от загуба на плода след манипулацията е около 0,5-1%. Поради инвазивния характер на манипулацията и възможен Rh конфликт майка/плод е важно профилактирането с анти-RhD антитела на Rh негативните майки (Фиг. 2).

Кордоцентезата представлява метод за пренатална диагностика, при които се взима кръв от фетуса през съдовете (обикновено вена) в пъпната връв. Извършва се след 18 г.с. Кръвта от фетуса може да бъде подложена на цитогенетичен анализ (по-бърз резултат и по-нисък риск от мозаицизъм), молекулярно-генетичен анализ, тест за инфекции, наследствени имунодефицитни състояния и хемоглинопатии, Rhesus-изоимунизация и др. Рискът от загуба на плода в следствие на процедурата е около 3%, поради което е рядко приложим у нас (Табл. 2).

Недостатъците на пренаталната диагностика:

- Анализът с новите молекулярни методи може да разкрие информация, за която няма категорични данни за генотипна-фенотипна корелация.
- Възникване на технически лабораторни затруднения и невъзможност за анализ на феталния материал (с вероятност <1%). Резултатът не винаги може да бъде интерпретиран категорично (при използване на някои молекулярно-генетични методи от най-ново поколение).
- Двусмислен, некатегоричен резултат, дължащ се на истински мозаицизъм (наличие на ≥ 2 клетъчни линии в един и същ организъм) или на контаминация с майчин генетичен материал. Това има своето

Табл. 2. Обобщена характеристика на пренаталните методи за генетична профилактика

Процедура	Период на провеждане	Характеристика на метода	Риск от процедурата
Биохимичен скрининг -ранен комбиниран - късен	11-13 ⁺⁶ г.с. 14 ⁺⁴ – 20 ⁺⁶ г.с.	Скринингов метод за отсяване на бременности с повишен риск за анеуплоидии, дефекти на неврална тръба, коремна стена и др.	няма
Фетална анатомия (морфология)	11-13г.с. 19-22г.с. 30-32г. с.	Диагностика на структурни аномалии с различна степен на чувствителност	няма
Тестване на свободна фетална ДНК в майчина кръв	След 9г.с.	Скринингов метод за търсене на анеуплоидии; потвърждение чрез инвазивен диагностичен метод	няма
Хорионбиопсия	11-12г.с	Възможен мозаицизъм; риск от контаминация с майчини клетки	2% - 3%
Амниоцентеза	16-19г.с	Най-широко прилаган инвазивен метод; относително късна манипулация; нисък риск от контаминация с майчини клетки	0,5% - 1%
Кордоцентеза	След 18г.с	Късен период на бременността	> 3%

значения за медико-генетичната консултация и тежестта на изява на съответното заболяване.

- Други случайни находки като условно балансирани преустройства (инверсии, транслокации), както и маркерни хромозоми (допълнителен неизвестен генетичен материал), невинаги могат да бъдат категорично интерпретирани (7).

Добро обучение и задълбочено познание от страна на медицинските кадри, адекватна финансова подкрепа и разбиране от страна на държавата са ключови за налагането на профилактичния подход като основна стратегия в здравеопазната система. Едновременно с това трябва да се възползваме от новите технологии, които ни предоставят нови възможности, създават се нови подходи и ни разкриват нови хоризонти.

ЛИТЕРАТУРА

1. www.geneticalliance.org.uk
2. Ангелова, Л., Гаданчева, В., Константинова, Д. и др. Опитът на генетична лаборатория Варна с амниоцентеза с генетичен анализ за периода 2006-2010 година // Акушерство и гинекология, 2012, 1, с. 8-12.
3. Ангелова, Л., Кирчев, Б. Практическо ръководство по пренатална диагностика. Варна, Университетско издателство на МУ Варна, 2014, с. 22-38.
4. Кременски, И. Концепция за развитието на Националната генетична лаборатория през 2011-2014 год. до МЗ. 2011.
5. Burow M. Non-invasive prenatal diagnosis with PraenaTest® as an alternative procedures, 10th Balkan congress of medical genetics 10-12.10.2013 Bled, Slovenia
6. Harper P. Practical genetic counseling, 7th ed., Edvart Arnold, London 2010, p. 115-135.
7. Mueller R., I. Young. Emery's elements of medical genetics. 11th ed. Elsevier Science, 2003, 303-313.
8. Nussbaum R., R. McInnes, H. Willard, A. Hamosh. Thompson & Thompson Genetics in Medicine, 7th ed. Saunders Elsevier 2007, p. 443-461.

Адрес за кореспонденция:

д-р Мари Хачмериян
Катедра по медицинска генетика, МУ-Варна,
Лаборатория по медицинска генетика
МБАЛ „Св.Марина“ ЕАД, Варна
e-mail: mari.hachmeriyana@gmail.com