4. *Лачинян Л. Е., Цатурян С. С., Давтян М. А.* Биолог. ж. Армении, *29*, 4, 1976.
5. *Verma N. S., Sharma D., Gollakota A.* Indian J. Biochem and Biophys, *139*, 1, 99, 1976.
6. *Ehmke A., Harhmann Th.* Phytochemistry, *15*, 11, 1611, 1976.
7. *Tawole M. O., Boulter D.* Plants, *134*, 1, 97, 1977.
8. *Kim E., Fitt P.* Biochem J., *161*, 2, 1977.
9. *Lowry O. M., Rosenbrough M. S., Farra A., Randale R. S.* J. Biol. Chem., *193*, 265, 1951.
10. *Ehmke A., Hartmann Th.* Phytochemistry, *17*, 4, 637, 1978.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXIX, № 2, 1986

УДК 576.312.32/38

КЛИНИКО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МОЗАИЧНЫХ АНОМАЛИЙ КАРИОТИПА

Н. П. КУЛЕШОВ, И. В. СИМОНЯН

Разработана схема проведения цитогенетического анализа с учетом диагностики мозаицизма при клинико-цитогенетических исследованиях.

Ключевые слова: аменорея, мозаицизм, ступенчатый анализ.

Цитогенетическая диагностика аномалий кариотипа гаметического происхождения, когда хромосомный набор всех клеток сформирован одинаково, не представляет больших трудностей. Обычно для их выявления требуется анализ не более 5—7 клеток. Трудности в диагностике связаны с аномалиями мозаичного типа, возникающими на стадии постзиготического деления. Организм в этом случае сформирован двумя, тремя и более клонами клеток с различной хромосомной конституцией, закрепившихся в онтогенезе клеточной селекцией. Соотношение клеточных клонов может варьировать в широких пределах и зависит от стадии развития зиготы, на которой произошло нарушение. Анализ литературных данных показывает, что в большинстве описанных случаев мозаицизма отношение одного из клонов к остальным составляет не менее 10% [1, 2], при этом их основная часть обусловлена аномалиями в системе половых хромосом. Распространенными формами мозаицизма являются варианты XO/XX, XO/XY, XY/XXY, XO/XXX и другие [2, 7], концентрирующиеся у больных с акушерско-гинекологической и эндокринной патологией.

Ранее нами были изложены принципы диагностики мозаицизма применительно к популяционно-цитогенетическим исследованиям, охватывающим большие группы популяций [3, 5]. Они не могут быть применены к условиям клинико-цитогенетического исследования, так как здесь требуется исключительно точная постановка диагноза.

В настоящей работе приводятся основные методические особенности проведения цитогенетического анализа с учетом диагностики мозаицизма при клинико-цитогенетических исследованиях.

Материал и методики. Исследована группа больных с первичной аменореей (80 женщин), находившихся на учете в кабинете гинекологической эндокринологии НИИ акушерства и гинекологии МЗ АрмССР. Материалом исследования являлись лимфоциты периферической крови, культивация которых осуществлялась по методике Хангерфорда [6]. Использовали G-технику окраски метафазных хромосом [4].

В основу схемы цитогенетического обследования был положен принцип так называемого ступенчатого анализа, а именно, если среди определенного количества исходно анализируемых клеток встречается хотя бы одна клетка с другой хромосомной конституцией, то в дальнейшем выборка клеток для анализа увеличивается до такого количества, когда с высокой вероятностью можно судить о наличии или отсутствии мозаицизма.

Число исходно анализируемых клеток зависит от уровня доверительной вероятности и возможного соотношения клеточных клонов. В настоящей работе минимальная частота встречаемости одного из клеточных клонов составляет 10%, что обосновано данными литературы [1, 2].

Если P = 0,95, тогда число клеток n, необходимое для исходного анализа, можно оценить согласно формуле биноминального распределения:

$$1 - [(1-p)^n + p^n - (1-p)^n p^n] \geq P, \qquad (I)$$

где P — минимальная частота одного из клеточных клонов (в данном случае P = 0,1).

Учитывая, что $p^n - (1-p)^n p^n \ll (1-p)^n$, соотношение (I) можно упростить:

$$1 - (1-p)^n \geq P. \qquad (II)$$

Подставляя численные значения, находим, что n = 29. Таким образом, чтобы исключить вероятность мозаицизма при соотношении клеточных клонов 10%:90% и более, необходимо анализировать 29 клеток. Если среди них не обнаружится ни одной клетки с другой хромосомной конституцией, тогда с вероятностью P = 0,95 можно сделать вывод об отсутствии мозаицизма.

Если среди исходно проанализированных 29 клеток хотя бы одна окажется с другой хромосомной конституцией, тогда число клеток для анализа необходимо увеличить. Их число определяется из выражения:

$$1 - C_n^m \cdot p^m (1-p)^{n-m} \geq P, \qquad (III)$$

где m — количество клеток с другой хромосомной конституцией среди n исходно проанализированных.

Согласно расчетам, если один и тот же тип аномалии повторяется в 4-х и более клетках, тогда с вероятностью P = 0,95 можно сделать вывод о наличии мозаицизма. В то же время, если среди 29 клеток одна, две или три окажутся с другой хромосомной конституцией (т. е. m = 1, m = 2 или m = 3), тогда число клеток увеличивается до 44 и т. д. Формула (III) является общим выражением, по которому, подставляя численные значения, определяется алгоритм схемы цитогенетического исследования с учетом диагностики мозаицизма. В табл. 1 приведен его обобщенный вариант.

Результаты и обсуждение. Из 80 цитогенетически обследованных больных с первичной аменореей мозаицизм выявлен у 17, что составляет 21%. Типы мозаицизма и частота клеточных клонов представлены в табл. 2.

Видно, что во всех случаях цитогенетический анализ был ограничен 29 клетками, при этом лишь в одном случае минимальная частота одного из клонов составляла 14%. Число исходно анализируемых клеток не является постоянным. Оно зависит от двух факторов: пропорции клеточных клонов и частоты артефактной анеуплоидии или хромосомных аберраций в культуре клеток. Например, у мозаика с соотношением клеточных клонов 50%:50% наличие мозаицизма устанавливается при анализе первых 5 клеток, при соотношении клеточных

Таблица 1

Схема клинико-цитогенетического исследования с учетом диагностики мозаицизма

Число анализируемых клеток	Число клеток с другой хромосомной конституцией	Заключение
29	0	Мозаицизм исключается
29	4	Мозаицизм
29	1—3	Число клеток увеличивается до 44
44	1	Мозаицизм исключается
44	5	Мозаицизм
44	2—4	Число клеток увеличивается до 57
57	2	Мозаицизм исключается
57	6	Мозаицизм
57	3—5	Число клеток увеличивается до 72
...	...	...

Таблица 2

Типы выявленных форм мозаицизма и соотношение клеточных клонов

Число проанализированных клеток	Тип аномального кариотипа и соотношение клеточных клонов, %	Порядковый номер клетки, выявляемой с наименьшей частотой
29	XO/XX (31:69)	5, 6, 7, 8, 11, 14, 20, 25, 29
29	XO/XX (79:21)	5, 6, 8, 10, 24, 26
29	XO/XX (34:66)	6, 7, 9, 10, 12, 17, 20, 23, 25, 27
29	XO/XX (21:79)	6, 8, 14, 19, 27, 28
29	XO/XX (79:21)	5, 6, 10, 13, 16, 25
29	XO/XX (31:69)	1, 2, 5, 6, 8, 11, 17, 24, 26
29	XO/XX (24:76)	3, 5, 9, 10, 15, 23, 27
29	XO/XX (21:79)	8, 15, 16, 20, 24, 28
29	XO/XX (17:83)	4, 13, 16, 18, 21
29	XO/XX (24:76)	1, 6, 9, 15, 25, 28, 29
29	XO/XX (34:66)	1, 3, 5, 10, 13, 15, 18, 20, 26, 29
29	XO/XX (83:17)	6, 12, 13, 14, 19
29	XO/XX_i (86:14)	1, 10, 23, 27
29	XO/XX_i (69:31)	3, 4, 13, 15, 17, 23, 24, 26, 27
29	XO/XX_r (76:24)	1, 2, 3, 11, 14, 25, 29
29	XO/XY (24:76)	8, 13, 15, 16, 18, 23, 29
29	XO/XX_q (28:72)	4, 6, 7, 10, 13, 22, 24, 27

клонов 25%:75%—при анализе первых 11 клеток и т. д. [1]. У выявленных нами мозаиков минимальная частота одного из клонов превышала 10% при анализе 29 клеток.

Другой учитываемый фактор в ходе исследования—артефактная анеуплоидия (в меньшей степени—спонтанные хромосомные аберрации), являющаяся результатом технических манипуляций или влияния

средовых факторов. Частота артефактной анеуплоидии в 72-часовых культурах лимфоцитов составляет в среднем 3—5% [3, 5], что создает определенные трудности при диагностике мозаицизма. В таких случаях следует иметь в виду, что:

из всех случаев анеуплоидии чаще всего встречается гипоплоидия (в наших исследованиях частота гипоплоидии составила 3,3%, гиперплоидии—0,2%);

артефактная утрата хромосомы в митозе тесно коррелирует с ее длиной: чем меньше хромосома, тем выше вероятность ее утраты; это означает, что даже при 5—7%-ной артефактной анеуплоидии максимальная частота утраты хромосомы не превышает 0,5%;

из всех описанных форм мозаицизма наиболее распространенными являются моносомия и трисомия по половым хромосомам;

случаи моносомии и трисомии аутосом, как правило, сопровождаются значительными нарушениями фенотипа.

Таким образом, в диагностике мозаицизма наибольшую трудность представляет моносомия в системе половых хромосом. Отметим, что это связано, с одной стороны, с высокой частотой артефактной анеуплоидии, с другой—тем обстоятельством, что при таких аномалиях кариотипа клинически редко выявляются фенотипические аномалии. Все эти данные свидетельствуют о необходимости придерживаться рекомендуемой схемы исследования, стандартизирующей клинико-цитогенетический анализ.

Из 17 выявленных нами мозаиков 8 могли бы быть диагностированы, исходя из анализа данных табл. 2, при исследовании исходных 11 клеток, а 9 других—при увеличении количества анализируемых клеток, согласно ранее опубликованной схеме [3]. Наконец, еще одно преимущество рекомендуемой схемы состоит в том, что увеличение числа анализируемых клеток до 29 позволяет с большей точностью определять соотношение клеточных клонов, что имеет важное значение при прогнозе для отдельных больных. Из данных, представленных в табл. 3, видно, что максимальная величина средней ошибки с

Таблица 3

Средняя ошибка при оценке частоты клонов при разных схемах исследования

n = 11, %	n = 11, %	n = 29, %	n = 29, %
45 : 55±16	27 : 73±14	31 : 69±9	24 : 76±8
64 : 36±15	36 : 64±15	79 : 21±8	34 : 66±9
36 : 64±15	76 : 24±11	34 : 66±9	83 : 17±7
18 : 82±12	87 : 13±7	21 : 79±8	86 : 14±7
73 : 27±14	71 : 29±11	79 : 21±8	69 : 31±9
55 : 45±16	64 : 36±15	31 : 69±9	76 : 24±8
36 : 64±15	22 : 78±11	24 : 76±8	24 : 76±9
17 : 83±8	36 : 64±15	21 : 79±8	28 : 72±8
22 : 78±9		17 : 83±7	

16% (при n=11) снижается до 9% (при n=29). Так, например, анализ 11 клеток у первой больной с кариотипом 45, XO/46, XX выявил соотношение клеточных клонов 45%:55% при средней ошибке 16%, тогда как при анализе 29 клеток соотношение клеточных клонов составило 31%:69%, а средняя ошибка—9%.

Таким образом, разработана схема проведения клинико-цитогенетического исследования больных с учетом диагностики мозаицизма, основанная на принципе ступенчатого анализа. Требуемое для анализа исходное количество клеток оценивается исходя из биномиального распределения $1-(1-P)^n \geqslant P$, с учетом уровня доверительной вероятности и соотношения клеточных клонов. Схема позволяет с вероятностью $P=0{,}95$ диагностировать мозаицизм при соотношении клеточных клонов 10%:90% и более.

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва,
Ордена «Знак Почета» НИИ акушерства и гинекологии
МЗ Армянской ССР, Ереван

Поступило 26.XI 1985 г.

ՄՈԶԱԻԿ ԱՆՈՄԱԼԻԱՆԵՐԻ ԿԱՐԻՈՏԻՊԻ ԿԼԻՆԻԿԱ-ԲՋՋԱԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԴԻԱԳՆՈՍՏԻԿԱՆ

Ն. Պ. ԿՈՒԼԵՇՈՎ, Ի. Վ. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

Մշակված է բջջագենետիկական անալիզի անցկացման սխեման՝ հաշվի առնելով մոզաիցիզմի դիագնոստիկան կլինիկա-բջջագենետիկական հետազոտությունների ժամանակ։

CLINICO-CYTOGENETICAL DIAGNOSIS OF MOSAIC ANOMALIES OF KARIOTYPE

N. P. KULESHOV, I. V. SIMONIAN

The scheme of carrying out cytogenetic analysis has been worked out, taking into consideration the diagnostics of mosaicism during clinico-cytogenetic investigations.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бочков Н. П.* Генетика человека: наследственность и патология. М., 1978
2. *Давиденкова Е. Ф., Вергинская Д. К., Тысячнюк С. Ф.* Клинические синдромы при аномалиях половых хромосом. Л., 1973.
3. *Кулешов Н. П., Алехин В. И.* Генетика, *1*, 143—151, 1974.
4. *Arright F., Hsu T. C.* Exp. cell. Res., *31*, 1, 305, 1965.
5. *Bochkov N. P., Kuleshov N. P., Chebotarev A. N., Alekhin V. I., Midian S. A.* Humangenetik, 1, 139—151, 1974.
6. *Hungerford D. A.* Stain Technology, *40*, 6, 333—338, 1965.
7. *Levine H.* Clinical cytogenetics, Boston, Brown and Company, 1971.