

Новые возможности пренатальной диагностики пола плода

О.В. Грищенко, А.В. Сторчак, Н.Г. Грищенко

Харьковская медицинская академия последипломного образования

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

Клиника репродуктивной медицины «Имплант»

Определение пола будущего ребенка для большинства родителей продиктовано любопытством. Статистические опросы свидетельствуют, что 90% будущих родителей желают знать как можно раньше пол плода, при этом 87% из них будут рады появлению малыша любого пола, лишь бы он был здоров. Знание пола плода позволяет им заранее подготовить приданое, декорировать детскую комнату с учетом пола, придумать имя и уже во время беременности обращаться к плоду по имени.

Беспокойство вызывают случаи, когда родители выясняют пол плода с целью абортирования детей «нежелательно» пола. Возрастающая доступность методик определения пола плода в некоторых странах уже сегодня вызывает обеспокоенность. В ряде стран (Индия, Китай, станы Кавказского региона) традиционно предпочтительным для семьи было рождение мальчиков. Если в естественных условиях на 100 девочек рождаются примерно 105 мальчиков, то за последние годы в ряде регионов отмечается резкая диспропорция в соотношении полов новорожденных. Внедрение в практику только ультразвуковых методик определения пола плода привело к прерыванию около 12 миллионов беременностей девочками в Индии с 1980 по 2010 год (Lancet, май 2011), а в Китайской провинции Хэнань соотношение новорожденных мальчиков и девочек увеличилось до 125 к 100. Подобный феномен в демографических показателях стран Кавказа отмечен исследователями Грузинского центра по исследованию населения (г. Тбилиси). Связывают его с практикой идентификации пола плода, особенно при второй-третьей беременности, что привело к соотношению новорожденных мальчиков и девочек 120 к 100.

Глава Центра биоэтики Пенсильванского университета А. Carlan выразил озабоченность тем фактом, что доступность методик раннего определения пола плода «открывает очень невеселые перспективы для еще не рожденных девочек, их абортирование может увеличиться во много раз» (Journal of the American Medical Association). Как подчеркивают ученые, через двадцать лет ситуация может стать еще более критической, и избыток представителей сильного пола по отношению к женщинам может достичь 10–20%. Вопрос о целесообразности сообщения будущим родителям пола плода без медицинских к этому показаний неоднократно поднимался на заседаниях Совета Европы.

В некоторых странах (Австрии, Германии, Швейцарии и пр.) выбор пола будущего ребенка запрещен законодательством. Это обусловлено тем, что при таком подходе к рождению ребенка будет нарушено природное равновесие. А в таких странах, как Япония, Австралия, Канада, Франция, заблаговременный выбор пола ребенка допускается лишь в том случае, если для этого имеются веские медицинские обоснования.

Впрочем, любое научное достижение, созданное с благой целью расширения человеческих возможностей, при недостаточном уровне морали в обществе может нести вред обществу. Идентификация пола плода для перинатолога прежде всего преследует цель предотвращения наследственных заболеваний.

В настоящее время в связи с последовательной расшифровкой человеческого генома появляются сведения о роли аномалий определенных генов в основе целого ряда заболеваний, этиология которых ранее не связывалась с наследственностью, более того, некоторые из них считались приобретенными. Генетические нарушения лежат в основе свыше 3000 заболеваний и более чем 460 синдромов, и большинство из них диагностируются постнатально. Своевременный прогноз и пренатальная диагностика генетических нарушений является эффективным инструментом снижения смертности и инвалидизации населения.

Ряд наследственных заболеваний сцеплен с полом, в связи с чем знание пола плода на ранних сроках гестации в совокупности с данными генетического анамнеза ближайших родственников может позволить более достоверно определить вероятность рождения больного ребенка и более избирательно рекомендовать инвазивные методы пренатальной диагностики для верификации наследственной патологии и принятия окончательного решения о судьбе данной беременности.

Поскольку X-хромосома включает в себя большее число генов, чем Y-хромосома, то и заболеваний, связанных с наследованием аномальной X-хромосомы больше. При сцепленных с полом наследственных заболеваниях болеют чаще мальчики. Если отец болен и патология является следствием измененного гена в Y-хромосоме, то все мальчики обречены на болезнь (рис. 1А). В женском кариотипе присутствуют две X-хромосомы, поэтому женщина может быть здоровой носительницей гена, ответственного за заболевание (если признак рецессивный), или больной (если признак доминантный). Если мать является носителем измененного гена в одной из X-хромосом, то вероятность болезни для мальчиков составляет 50%, и до 50% девочек могут быть, как и мать, носительницами измененного гена (если признак рецессивный) (рис. 1В) или больными (если признак доминантный) (рис. 1С). Если при наличии патологии в гене, локализованном в X-хромосоме, заболевание передается от матери к сыновьям, а от отца к девочкам (крискросс наследование), то в случае с Y-хромосомой заболевание передается только от отцов к сыновьям (рис 1).

Учитывая, что при риске рождения больного ребенка свыше 20% (высокий риск) от деторождения рекомендуют отказаться, для пар, где один из будущих родителей имеет патологию, сцепленную с полом, или является ее носителем, знание пола будущего ребенка является определяющим.

Гены, участвующие в патогенезе мультифакториальных заболеваний, могут быть расположены в половых хромосомах и (или) в митохондриальной ДНК, ответственной за развитие митохондриальных болезней. Мутации генов митохондрий наследуются исключительно по материнской линии, причем у пациентки с митохондриальным заболеванием матери все дети больны независимо от того, болен отец или нет. В паре родителей, где болен отец, а мать здорова, у детей митохондриальные болезни отсутствуют.

При прогнозировании наследственной патологии следует учитывать, что на реализацию генетической аномалии в заболевании будет оказывать влияние пенетрантность и экспрессивность.

A

	XX	X	X
XY			
X	XX	XX	XX
Y	XY	XY	XY

B

	XX	X	X
XY			
X	XX	XX	XX
Y	XY	XY	XY

C

	XX	X	X
XY			
X	XX	XX	XX
Y	XY	XY	XY

Рис. 1. Сцепленное с полом наследование

Пол – это совокупность морфологических, физиологических, биохимических, поведенческих и других признаков организма, обуславливающих репродукцию. Поэтому наряду с паспортным у человека имеется пол генетический, гонадный, генитальный, гормональный и психологический. В подавляющем большинстве случаев они совпадают, что характеризует гармоничное половое развитие.

Традиционно признаки пола делят на первичные (наружные и внутренние половые органы, формирующиеся к моменту рождения) и вторичные (внешние признаки, развивающиеся под воздействием половых гормонов в пубертатный период).

Генетический пол плода определяется набором половых хромосом (гоносом), который формируется при слиянии сперматозоида и яйцеклетки. При физиологическом формировании гамет сперматозоид несет половую хромосому X или Y, а яйцеклетка только X-хромосому. Набор 46, XX является кодом развития женской особи, а набор 46, XY – мужской. При этом решающую роль в детерминации пола будущего человека играет отцовский сперматозоид.

Однако следует помнить, что еще на этапе формирования гамет (сперматозоидов и яйцеклеток) возможны нарушения в расхождении половых хромосом (рис. 2). Если при нормальном течении мейоза у женского организма могут образовываться только один тип яйцеклеток – содержащие одну X-хромосому, то при нарушениях могут образовываться содержащие две X-хромосомы (XX) и не содержащие хромосом (0). У мужского организма в норме образуются два типа сперматоидов, содержащие X- и Y- хромосому, а при нарушении расхождения половых хромосом – содержащие две половые хромосомы (XY) и без половых хромосом.

В результате нарушений расхождения половых хромосом возможны следующие варианты комбинаций половых хромосом в зиготе у человека: XX – здоровая женщина, XX* – здоровая женщина, но обе хромосомы женские, XY – здоровый мужчина, XY* – здоровый мужчина, но обе хромосомы мужские. Варианты YO и O0 – нежизнеспособны. Остальные определяют формирование тяжелой патологии половой

и центральной нервной системы: XXU и XXXU – синдром Кляйфельтера, X0 – синдром Шершевского–Тернера.

На 3-й неделе эмбриогенеза в стенке желточного мешка возникают первичные половые клетки – предшественники оогониев и сперматогониев. На 4-й неделе на медиальных поверхностях первичных почек появляются утолщения – половые тяжи. Это зачатки половых желез, состоящие из мезенхимных клеток первичной почки и покрытые целомическим эпителием. До 5–6-й недели половые тяжи у эмбрионов мужского и женского пола не различаются (индифферентные половые железы) и эмбрион имеет только генетический пол. Формирование половых желез детерминировано генетическим полом.

На 5–6-й неделе эмбриогенеза первичные половые клетки перемещаются из желточного мешка в половые тяжи. В норме половые тяжи дифференцируются в яичники, если они заселяются первичными половыми клетками с кариотипом 46, XX, и в яички – если они заселяются клетками с кариотипом 46, XY. Превращение половых тяжей в яички определяется геном SRY (sex-determining region Y), локализованным на Y-хромосоме. Ген SRY кодирует фактор развития яичка. Этот ДНК-связывающий белок индуцирует транскрипцию других генов, направляющих дифференцировку яичек. С этого момента начинается становление гонадного пола.

Последующее развитие внутренних и наружных половых органов определяется половыми гормонами, которые начинают вырабатываться только что появившимися половыми железами (семенниками или яичниками). Начиная с 6-й недели половые железы эмбриона вырабатывают половые гомоны, которые и определяют развитие внутренних и наружных половых органов (рис. 3). Причем определяющим является уровень тестостерона, который запускает формирование типичных мужских половых органов, при его недостатке альтернативно развиваются – женские. Уже на 8–9-й неделе внутриутробного развития у плода с мужским генотипом и с формирующимися семенниками достаточный уровень тестостерона стимулирует развитие протоков первичной почки (Вольфовых протоков) в придаток яичка, семявыносящие протоки и семенные пузырьки, а ингибитор парамезонефрических протоков (Мюллеровых протоков) вызывает атрофию одноименных протоков. При отсутствии тестостерона (у плодов с женским генотипом и формирующимися яичниками) парамезонефрические протоки развиваются в матку, маточные трубы и верхнюю треть влагалища, а протоки первичной почки не получают стимулов к развитию. Таким образом, анатомические различия в строении половых органов появляются на 8-й неделе внутриутробного развития и обусловлены они прежде всего тестостероном. Большинство этапов формирования наружных и внутренних половых органов как у плода мужского, так и женского пола, завершается уже к 14-й неделе гестации, однако развитие отдельных элементов репродуктивного тракта будет продолжаться вплоть до срока родов. Кроме того, на этапе внутриутробного развития (16–28-я неделя) половые гормоны фор-

	XY	X	Y	XY	0
XX					
X	XX	XY	XXY	XO	
XX	XXX	XXY	XXXU	XX*	
0	XO	YO	XY*	O0	

Рис. 2. Варианты наборов половых хромосом, которые могут возникнуть при нарушениях в расхождении гоносом на этапе формирования гамет

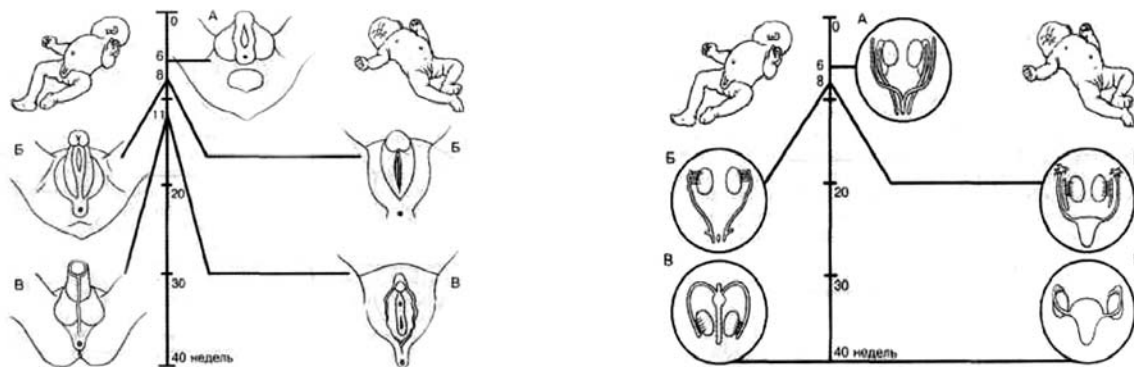


Рис. 3. Сроки формирования внутренних и наружных половых органов у плода

мируют половую ориентацию головного мозга (гипоталамических структур).

Таким образом, формирование пола человека – это сложный, растянутый во времени, последовательный и преемственный процесс: генетический пол формирует гонадный, гонадный пол благодаря половым стероидам – генитальный, гормональный, фенотипический и психологический.

В связи с тем что для целого ряда заболеваний установлено сцепленное с полом наследование, наибольший интерес для перинатологии представляют методики программирования пола плода. Однако большинство методик программирования пола, основанных на расчетах дня зачатия, возрасте родителей, особенностях рациона будущей матери, не имеют доказанной эффективности. На сегодняшний день программирование пола плода возможно только при использовании вспомогательных репродуктивных технологий.

Одной из таких методик является сортировка сперматозоидов на несущих X- и Y-хромосому, с последующим использованием для внутриматочной инсеминации или экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) необходимого образца. Методика осуществляется с использованием системы MicroSort® и она основана на том, что сперматозоид, несущий Y-хромосому содержит на 3% меньше ДНК, чем несущий X-хромосому. Эффективность методики по программированию женского пола плода достаточно высока и достигает 90%, эффективность программирования мужского пола плода несколько ниже – 73%.

Программирование пола плода может осуществляться путем предимплантационной генетической диагностики (ПГД) пола плода в рамках программы ЭКО с последующим переносом в матку blastocyst с эмбриобластом определенного пола. Методика разработана в 1967 году Робертом Эдвардсом и Дэвидом Гарднером и была применена для селекции пола у кроликов. В 1989 году Хандисайд и коллеги провели первую успешную ПГД с целью определения пола у человека для предотвращения возможности наследования X-сцепленных заболеваний. В настоящее время для ПГД используют методику флюоресцентной гибридизации in situ (FISH). Ее преимущество заключается в возможности одновременно идентифицировать как аутосомы, так и половые хромосомы, что позволяет определять не только пол ребенка, но и анеуплоидии по 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22-й, X- и Y-хромосомам. В настоящее время ПГД возможна в отношении около 100 наследственных заболеваний, для которых определена структура гена, его расположение на хромосоме и мутация, приводящая к заболеванию. Наиболее информативна ПГД при проведении ЭКО с интраплазматической инъекцией сперматозоидов (ИКСИ), так как в этом случае исключается риск попадания в анализ генетического матери-

ала сперматозоида, не участвовавшего в оплодотворении. На 3-й день после оплодотворения эмбрион состоит из 6–8 blastomeres, которые равноценны и могут развиваться в любые клетки и способны к взаимозаменяемости. Для ПГД производится забор одного blastomere, что не нарушает дальнейшего развития эмбриона, так как оставшиеся blastomeres замещают дефект. К 5-м суткам при отсутствии генетических аномалий blastocyst переносится в полость матки. Таким образом проведение ПГД возможно только с 3-х по 5-е сутки после оплодотворения. Достоверность ПГД составляет 97–98%, при этом риск врожденных пороков развития не превышает популяционный – 2–3%.

Для идентификации пола плода в настоящее время существует ряд методик, основанных на генотипировании (определение генетического пола плода), на выявлении метаболитов половых стероидов (определение гормонального пола плода), на ультразвуковой визуализации наружных половых органов (гонадно-генитальный пол плода).

Для определения генетического пола плода на протяжении последних десятилетий применяли инвазивные цитогенетические методики пренатальной диагностики: биопсия хориона (8–12-я неделя гестации), амниоцентез (13–22-я неделя гестации), кордоцентез (с 22-й недели гестации). В полученных клетках хориона и плода определяется кариотип (количество и структура хромосом).

Гонадно-генитальный пол традиционно определяется путем ультразвуковой визуализации. Процесс формирования половых органов завершается к 12-й неделе, в дальнейшем вплоть до срока родов будет происходить их развитие. По мнению большинства исследователей, достоверная идентификация пола плода с помощью ультразвуковой визуализации возможна только с 15-й недели беременности. Точность ультразвуковой идентификации плода после 17-й недели достигает 85–87% независимо от пола.

В настоящее время предлагается новая неинвазивная методика определения генетического пола плода путем идентификации ДНК плода в крови матери. В случае идентификации в крови беременной ДНК Y-хромосомы – пол плода мужской, при ее отсутствии – пол плода женский. Автором методики является генетик D. Bianchi (Tufts University School of Medicine, USA). Рекомендуемый срок гестации для тестирования 8–10 нед, точность методики достигает 95%.

Об аналогичной методике сообщила группа исследователей под руководством П. Шеффера (Университет Амстердама, Нидерланды). Принцип основан на выделении в крови беременной ДНК с генами типичными только для Y-хромосомы: SRY, который отвечает за развитие семенников, и гена DYS-14, также определяющего мужской пол ребенка. Тестирование возможно с 5-й недели гестации. Осуществляется за-

бор крови у биологического отца ребенка. Для установления женского пола плода Шеффер и его коллеги разработали технологию выявления в образцах материнской крови фрагментов ДНК, индивидуально специфических для отца, так называемых участков генетического полиморфизма. Если такой фрагмент обнаруживается (и аналогичных специфических последовательностей не выявлено в собственной наследственной информации матери), но при этом фрагментов Y-хромосомы нет, можно утверждать, что развивающийся плод относится к женскому полу. Методика занимает до 4 дней, точность достигает 100%. Следует отметить, что методики определения генетического пола плода являются дорогостоящими и проводятся в ограниченном числе лабораторий.

По нашему мнению, среди методик ранней идентификации пола плода заслуживает внимания методика определения гормонального пола плода – ТестПол (Swiss American Products, США). Методика основана на идентификации в моче беременной метаболитов половых стероидов плода. Отличительной особенностью предлагаемой методики является возможность проведения тестирования беременной самостоятельно. Эффективность методики доказана для диапазона 8–34 нед гестации. Однако учитывая, что мы не всегда достоверно знаем гестационный срок, а достаточный для формирования половых органов стероидогенез в гонадах плода мужского пола начинается с 8–9-й недели гестации, рекомендуется начинать тестирование с 10 нед. Для тестирования используется утренняя моча, 20 мл мочи вводят в стакан с реагентом, размешивают 10 с, чтение результата – через 5 мин. При наличии в моче метаболитов половых стероидов плода мужского пола моча окрасится в зеленоватый цвет, при их отсутствии цвет не изменяется или становится чуть ярче. Клинические исследования методики проведены в США (2006–2008), в Австралии (2008–2009), в Мексике (2008–2009), в Российской Федерации под патронажем НИИ ОММ Росмедтехнологий (август 2009 – июнь 2010). Доказана клиническая точность методики, достигающая 95%. Методика зарегистрирована МЗ Украины в 2010 году.

Нами было проведено собственное клиническое исследование эффективности определения пола плода с помощью ТестПола в сроке гестации до 12 нед.

В исследовании приняли участие 30 беременных в сроке гестации 10–12 нед, которым при первом визите в женскую консультацию при постановке на учет в связи с беременностью было предложено установить пол плода. Ни одна из беременных от предложенного тестирования не отказалась, все беременные отнеслись к предложенной возможности с большим интересом. Критерием исключения из исследования в соответствии с рекомендациями к тест-системе явилось: наличие у беременной верифицированной гиперандрогении, прием прогестерона (есть сведения, что его прием влияет на уровень андрогенов и может способствовать получению ложной реакции, соответствующей мужскому полу плода), половая жизнь за 48 ч до тестирования, прием антибиотиков. Средний возраст беременных составил 24 года, большинство – 19 (63,3%) женщин было первобеременными. Для всех женщин их беременность были желанной, но только у 8 (26,7%) беременных запланированной. В нашем исследовании не было пациенток с отягощенным семейным анамнезом наследственной патологией, сцепленной с полом. Большинство беременных – 24 (80,0%) на момент тестирования не имели определенных предпочтений в отношении пола плода, 4 (13,3%) женщины хотели бы иметь мальчика, так как уже имели первого ребенка женского пола, 2 (6,7%) – хотели бы иметь девочку. Несмотря на наличие у 6 беременных определенных предпочтений в отношении пола плода, ни одна из пациенток не допускала возможности прервать данную беременность в связи с несоответствием результата тестирова-

ния с их ожиданиями. Это свидетельствует об отсутствии в ментальности наших соотечественниц склонности к селективному прерыванию беременности.

Все пациентки перед тестированием прошли обследование в соответствии с требованиями, предъявляемыми к первому визиту беременной приказом № 417 МЗ Украины. Срок гестации устанавливали путем расчетов по первому дню последней менструации, по результатам бимануального исследования и по ультразвуковой биометрии. Выбор срока гестации для тестирования был продиктован желанием определить эффективность методики в малых сроках, когда ультразвуковые методы идентификации пола плода невозможны, и для пациенток с отягощенным семейным анамнезом наследственной патологией, сцепленной с полом, для ранней идентификации пола плода остаются только методики, основанные на генотипировании.

Результаты тестирования ТестПолом сравнивали с результатами ультразвуковой визуализации наружных половых органов плода при плановом втором ультразвуковом скрининге в сроке гестации 16–21 нед и с фенотипическим полом плода при рождении. Совпадение результатов ТестПола с полом плода при рождении составило – 28 (93,3%) результатов. Ошибочные результаты были получены в 2 (6,7%) случаях, когда ТестПол указал результат – «девочка», а родились мальчики. Анализ причин ошибочных результатов позволяет предположить, что в этих случаях не произошло изменения окраски мочи при тестировании в связи с недостаточно высоким содержанием в этом сроке гестации (10 нед) в моче метаболитов мужских половых стероидов.

Таким образом, определение пола плода методом ТестПол в сроке гестации 10–12 нед является высокоэффективным, доступным и легко выполнимым самой пациенткой. Метод позволяет идентифицировать гормональный пол плода, который определяет генитальный, фенотипический и психологический. Использование методики определения пола плода ТестПол на ранних сроках беременности в совокупности с генетическим анамнезом и информацией о типе наследования патологии, сцепленной с определенным полом, позволит принять правильное решение о судьбе данной беременности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бадурашвили И., Меле Ф., Валлен Ж. Почему меняется соотношение полов среди новорожденных в Кавказских странах? // Демоскоп Weekly. – 2003. – № 131. – 132 с.
2. Курило Л.Ф. Генетически обусловленные нарушения мужской репродуктивной системы. Сб. Сексология и андрология. Киев 1996; 28 – 46.
3. Affara N., Bishop C., Brown W. et al. Report of the international workshop on Y chromosome mapping 1995. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 73:33 – 76.
4. Ion R., Telvi L., Feingold J. et al. Y chromosome abnormalities associated with mental retardation and dismorphia. *European society of human genetics. 26th annual meeting. Paris, France, 1994; 171.*
5. Micic M., Nikolis J., Micic S., Diklic V. Y chromosome anomalies and male fertility. *Hellenic Association of medical geneticists and university of Thessaloniki. 1st Balkan meeting on human genetics. Greece, 1994; 91.*
6. Ворсанова С.Г., Шаронин В.О., Курило Л.Ф. Аномалии половых хромосом при нарушении репродуктивной функции у мужчин // Проблемы репродукции. – 1998. – № 2.
7. Edwards RG, Gardner RL (May 1967). «Sexing of live rabbit blastocysts». *Nature* 214 (5088): 576–7.
8. Handyside AH, Lesko JG, Tarjn JJ, Winston RM, Hughes MR (Sep 1992). «Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis». *N. Engl. J. Med.* 327 (13): 905–9.
9. Coutelle C, Williams C, Handyside A, Hardy K, Winston R, Williamson R (Jul 1989). «Genetic analysis of DNA from single human oocytes: a model for preimplantation diagnosis of cystic fibrosis». *BMJ* 299 (6690): 22–4.
10. Holding C, Monk M (Sep 1989). «Diagnosis of beta-thalassaemia by DNA amplification in single blastomeres from mouse preimplantation embryos». *Lancet* 2 (8662): 532–5.