

УДК 004.891.3:575:616-074

Компьютерные диагностические системы в практике генетического консультирования

Е. Я. Гречанина, Ю. Б. Гречанина, И. В. Новикова,
А. В. Христинич, Т. М. Ткачева

Харьковский специализированный медико-генетический Центр,
кафедра медицинской генетики Харьковского государственного
медицинского университета, Украина

Резюме

В статье «Компьютерные диагностические системы в практике генетического консультирования» представлены результаты использования современных компьютерных технологий в генетической практике. Указано, что их применение повышает точность выявления хромосомной патологии в цитогенетике; позволяет выявлять патологические метаболические нарушения при использовании современного биохимического метода диагностики – высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: цитогенетика, хромосомный набор, кариотип, хроматографические методы, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Клин. информат. и Телемед.
2005. Т.2. №1. с.62–66

Введение

Современные компьютерные технологии широко используются в генетической практике. Их применение в цитогенетике дает возможность выявлять хромосомную патологию; в биохимической генетике – выявлять первичные и вторичные метаболические нарушения.

До широкого использования компьютерных технологий анализ хромосом проводился методом световой микроскопии с последующей зарисовкой или раскладкой кариотипа по фотоотпечаткам хромосомного набора. Длительность и трудоемкость метода требовали разработки современных технических подходов к решению проблемы. Значительный успех в развитии цитогенетики был обеспечен появлением современных компьютерных систем.

В генетической практике для диагностики наследственных нарушений обмена (НБО) аминокислот (АК) проводится количественное определение их уровня в биологических жидкостях. С этой целью широко используются хроматографические методы. На этапе предварительной диагностики мы использовали полуколичественный метод – тонкослойную хроматографию (ТСХ) АК. Однако недостаточная разрешающая способность метода требовала введения точных методов количественного анализа. Для подтверждающей диагностики использовали количественный анализ АК, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Целью данного исследования явилось изучение эффективности работы

компьютерных диагностических систем «CIREС» и «METASYSTEMS», предназначенных для исследования хромосом в различных тканях; высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с программным обеспечением «Millenium» для анализа свободных АК (38 показателей) биологических жидкостей.

Методы

Клиническим материалом для исследования кариотипа служили образцы периферической и пуповинной крови плода, клетки ворсин хориона и плаценты, амниоциты. С 1994 года кариотипирование проводили с использованием системы «CIREС» фирмы Carl Zeiss. С июля 2002 года цитогенетическая лаборатория и лаборатория пренатальной диагностики ЦКГ и ПД начали проводить исследования с помощью высококачественного микроскопа Axioskop 2 PLUS фирмы Carl Zeiss и соответствующей системы анализа изображения METASYSTEMS с программным обеспечением IKAROS и ISIS.

Материалом для исследования свободных аминокислот (АК) служили образцы крови и суточной мочи пациентов с предполагаемым нарушением обмена АК. Использовали метод анализа фенилтиокарбамидовых производных аминокислот с последующим разделением с помощью обращенной фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Количественный расчет хроматографических профилей прово-

дили на ПЭВМ с помощью программного обеспечения Millenium. Для выявления наследственных болезней обмена (НБО) АК нами был использован клинико-биохимический подход. Использовали хроматографический метод, предложенный фирмой Waters для комплексного разделения АК. Анализ включал: доколоночную дериватизацию с фенилизотиоционатом (ФИТЦ); разделение на колонке с обращенной фазой и ультрафиолетовым детектированием (254 нм); построение градуировочной зависимости; количественный анализ хроматографических профилей с помощью программного обеспечения «Millenium».

Для градуировки использовали смесь основных, нейтральных и кислых АК, «Sigma» (концентрация «исходного раствора» – 2,5 мкмоль/мл. В качестве «свидетелей» использовали АК производства «Sigma» и «ICN».

Результаты и обсуждение

При кариотипировании за период с 1994 года с использованием системы «CIREС» фирмы Carl Zeiss было выполнено 11771 пост- и пренатальных исследований.

В 2002–2003 годах было проведено 3020 цитогенетических исследований хромосомного набора. Патологические изменения выявлены в 15,3%.

Среди идентифицированной патологии наряду с анеуплоидиями (49,1%) и структурными аномалиями (12%), выявлены редкие случаи сочетанной патологии и полиморфизма (43%). На рисунке 1 представлен кариотип больного с синдромом Дауна.

На рисунке 2 представлен кариотип больных со структурными хромосомными аномалиями – транслокацией (X;7) (6;12); маркерной хромосомой mar; t (13;14).

При исследовании свободных аминокислот за период с 1996 по 2003 г. было выполнено 71274 анализа, обследовано 1916 больных, обратившихся за медико-генетической помощью.

Для количественного обсчета и построения градуировочной зависимости мы использовали стандартную смесь АК в различной концентрации, воспроизводимую по времени. На рисунке 3 представлен график градуировочной зависимости с расчетом статистических характеристик для каждой из 38 аминокислот на примере таурина.

На рисунке 4 представлены хроматограммы сыворотки крови в норме и при патологии, выполненные с помощью ВЭЖХ.

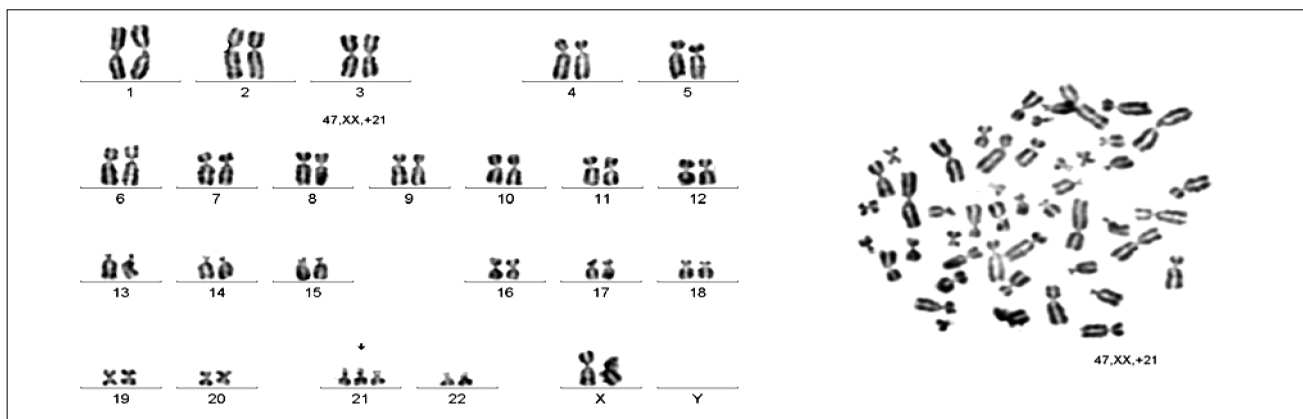


Рис. 1. Кариотип больного с синдромом Дауна.

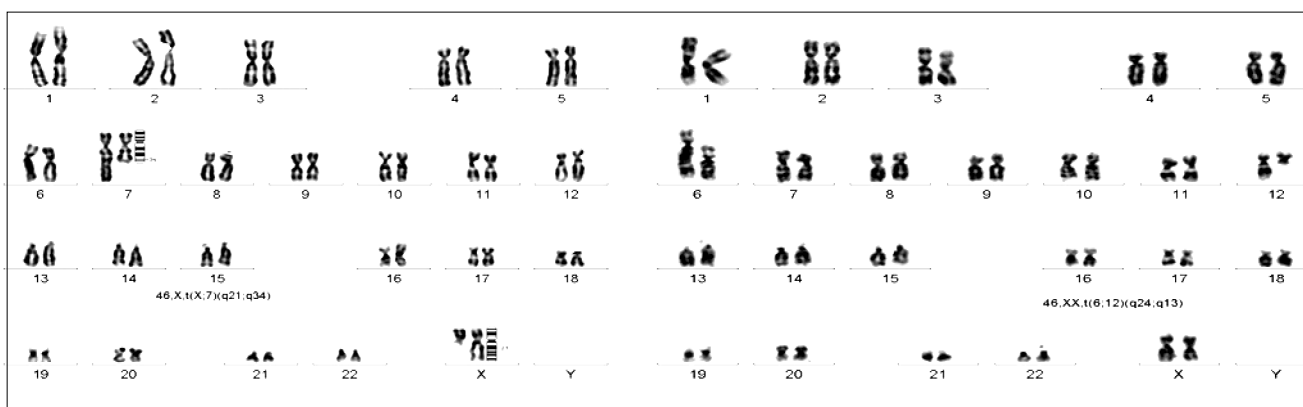


Рис. 2. Структурные хромосомные аномалии — транслокация (X;7) (6;12); маркерная хромосома mar; t (13;14).

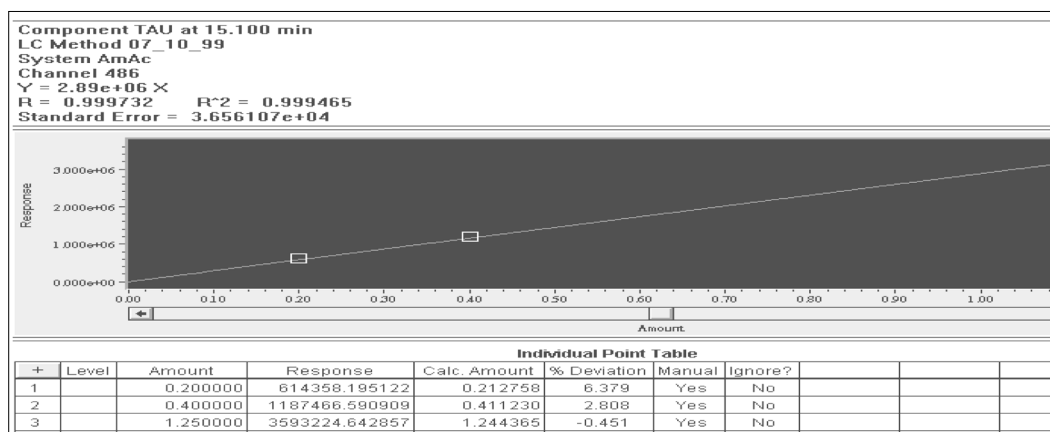


Рис. 3. График градуировочной зависимости для количественного расчета аминокислоты таурина.

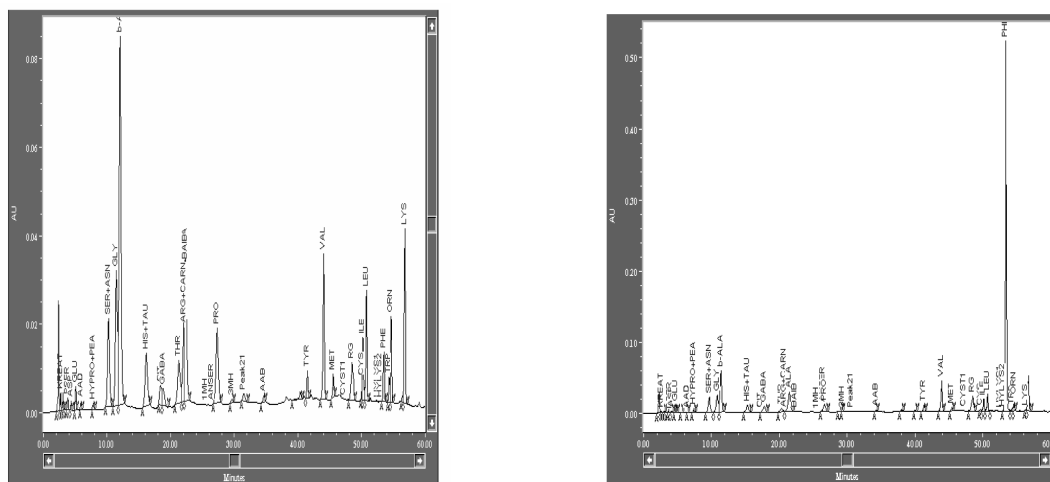


Рис. 4. Хроматограммы (ВЭЖХ) сыворотки крови в норме и у ребенка с фенилкетонурией.

Обязательным условием обеспечения качества лабораторного процесса являлось участие в программах внешнего контроля качества (ВКК). Центр клинической генетики принимал участие в системе ВКК Великобритании (UK NEQAS) и США (CDC) для массовых скринирующих программ. В лабораторию 1 раз в 2 месяца поступали образцы крови, высушенные на фильтровальной бумаге Шляйхер и Шуль №903, содержащие фенилаланин (ФА) в различной концентрации. Каждый лот содержал по 6 контрольных проб. За период участия в программе ВКК Великобритании проведено определение уровня ФА в 126 образцах (21 лот, содержащий по 6 образцов каждый). Результаты проведенных исследований заносились в базу данных и по электронной почте отправля-

лись в координационный совет, который находится в г. Бермингем (Англия). По результатам обработки данных схемы ВКК UK NEQAS, которые поступали в лабораторию, суммарное отклонение среднего значения от целевого (BIAS) для ФА составило 0,9 % (рисунок 5).

Анализ изменений в количественном содержании свободных АК сыворотки крови дал возможность выявить: повышение уровня АК в 10,2% наблюдений; из них — за счет незаменимых АК — 3,4%, за счет заменимых — 4,6%, за счет АК, не включенных в полипептидную цепь — 2,1%. Снижение уровня АК выявлено в 8,5% наблюдений, из них — за счет незаменимых АК — 3,0%, за счет заменимых — 3,6%, за счет АК, не включенных в полипептидную цепь — 1,8%.

Компьютеризированная диагностическая система Waters для анализа свободных АК дает возможность: записи полученных хроматографических профилей, просмотра хроматограмм; построения градуировочной зависимости с расчетом статистических характеристик, наложения хроматографических профилей, сравнения со стандартной хроматограммой, обчета неизвестных проб на основании созданного расчетного метода, выведения полученных количественных результатов на печать.

Комплексный клинко-биохимический подход в диагностике НБО АК дал возможность из 67715 больных, обратившихся в Центр клинической генетики и пренатальной диагностики (1998–2001 гг.) выявить 269 больных с НБО АК, что составило 3,9 больных

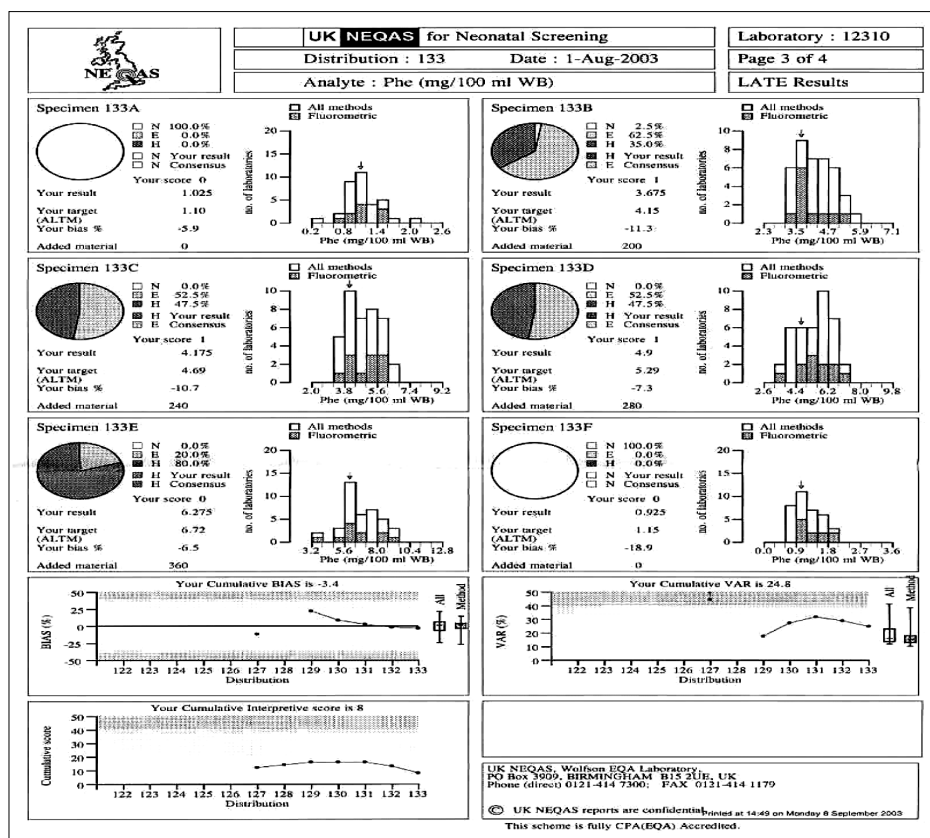


Рис. 5. Результаты участия в программе ВКК Национальной схемы контроля качества Великобритании для массовых скринирующих программ.

на 1000 обратившихся за медико-генетической помощью.

Квалификация исследователя в комплексе с точной компьютерной обработкой дает возможность точного количественного анализа 38 АК и их метаболитов.

Выводы

Использование современных технологий в диагностике хромосомной патологии дает возможность изучать численные, структурные перестройки, исследование полиморфизма и хромосомной нестабильности не только классическими, но и молекулярно-цитогенетическими методами.

Количественный анализ свободных АК биологических жидкостей с помощью ВЭЖХ дает возможность наряду с повышением, выявлять снижение уровня АК, что является необходимым условием для выявления НБО АК, повышает точность медико-генетического консультирования.

Литература

1. Бочков Н. П. Клиническая генетика. – М., 1997.
2. Захаров А. Ф., Бенюш В. А., Кулешов Н. П., Барановская Л. И. Хромосомы человека. Атлас. – М., 1982. – с. 44–50, 94–123.
3. Кулешов Н. П. Клиническая цитогенетика в Российской Федерации.: Материалы научно-практической конференции «Современные методы диагностики наследственных болезней». – Москва, 2001.
4. Хромосомные синдромы и аномалии. Классификация и номенклатура Ворсанова С. Г., Юров Ю. Б., Чернышов В. Н. – Ростов-на-Дону: Изд.РГМУ, 1999. – 192 с.
5. Bidlingmeyer B. A., Cohen S. A. and Tarvin T. L. 1984. J. Chromatogr. v. 336. p. 93–104.
6. Cohen S. A. and Strydan D. J. 1988. Anal Biochem. v. 174. p. 1–16.
7. Cohen S. A., Bidlingmeyer B. A. and Tarvin T. L. 1986. v. 320. p. 769–770.
8. Dickinson J. C., Rosenblum H. and Hamilton P. B. Pediatrics. 1965. v. 36. p. 2–13.
9. Edman P. and Begg G. 1967. European J. Biochem. v. 1. p. 80.
10. Evans C. T., Cohen S. A. and Slaughter C. A. 1989. Anal Biochem. v. 176. p. 269–277.

11. Gerritsen T., Rekberg M. L. and Waisman H. A. Anal Biochem. 1965. v. 11. p. 460–466.
12. Stein W. A. and Moore S. J. Biol Chem. 1954. v. 221. p. 916–926.

Computer diagnostic systems in practice of genetic consultation

E. Ya. Grechanina, Ju. B. Grechanina, I. V. Novikova, A. V. Hristich, T. M. Tkachova

Kharkiv Specialized Medical-Genetic Centre, Department of Medical Genetics of Kharkiv State Medical University, Ukraine

Abstract

In article «Computer diagnostic systems in practice of genetic consultation» are submitted results of use of modern computer technologies in genetic practice. It is specified, that their application raises accuracy of revealing of a chromosomal pathology in cytogenetics; allows revealing pathological metabolites with using of modern biochemical method of diagnostics — high performance liquid chromatography.

Key words: cytogenetic, chromosomal complement, karyotype, chromatographic methods, high performance liquid chromatography.

Комп'ютерні діагностичні системи в практиці генетичного консультування

*О. Я. Гречанина, Ю. Б. Гречанина,
І. В. Новікова, А. В. Христин,
Т. М. Ткачова*

Харківський спеціалізований медико-генетичний Центр, кафедра медичної генетики Харківського державного медичного університету, Україна

Резюме

У статті «Комп'ютерні діагностичні системи в практиці генетичного консультування» представлені результа-

ти використання сучасних комп'ютерних технологій у генетичній практиці. Вказано, що їхнє застосування підвищує точність виявлення хромосомної патології в цитогенетиці; дозволяє виявляти патологічні метаболіти при використанні сучасного біохімічного методу діагностики – високоефективної рідинної хроматографії.

Ключові слова: цитогенетика, хромосомний набір, каріотип, хроматографіческие методи, високоефективна рідинна хроматографія.

Переписка

д.мед.н., профессор, член-коор. АМН України **Е. Я. Гречанина**,
Харьковский специализированный
медико-генетический Центр,
кафедра медицинской генетики
Харьковского государственного
медицинского университета
эл. почта: mgc@ukr.net