

## Усовершенствованная методика культивирования и фиксации амниоцитов человека

С. Б. Арбузова, Л. А. Хлевная, С. А. Малова

Донецкий межобластной медико-генетический центр  
340000, Донецк, ул. Артема, 57

*Описаны модификации, предложенные к классическим методикам культивирования и фиксации амниоцитов. Усовершенствованная методика позволяет сократить время культивирования в 8—12 сут, увеличить число метафазных пластинок на анализируемых препаратах, улучшить их качество.*

**Введение.** Усовершенствование методов культуральных исследований имеет важное теоретическое и практическое значение в решении целого ряда медико-биологических проблем.

Культивирование амниоцитов для определения кариотипа плода используется в пренатальной диагностике хромосомных синдромов, занимающих одно из ведущих мест в структуре причин детской смертности и инвалидности. Получение амниотической жидкости не представляет сложности и производится в большинстве случаев с помощью транс-абдоминального амниоцентеза, являющегося наиболее доступным, информативным и безопасным из всех предложенных на сегодняшний день инвазивных манипуляций [1—5]. Однако широкому применению этого метода, в частности в Украине, препятствуют высокая стоимость реактивов и длительные сроки культивирования при использовании классических методик. Актуальной проблемой также остается повышение качества хромосомных препаратов. В связи с этим целью нашего исследования состояла в усовершенствовании традиционных методик культивирования и фиксации амниоцитов.

**Материалы и методы.** Модификации, предложенные к классическим методикам культивирования и фиксации амниоцитов, были отработаны на примере 150 культур. Параллельно в 30 случаях осуществляли культивирование и фиксацию по методикам, предложенным Джекобсоном, Надлером и Нельсоном [6—8]. Для работы использовали пробы

амниотической жидкости, полученные на 18—21-й неделях беременности. Диагностический амниоцентез проводили под контролем ультразвукового сканера Aloka SSD-630.

**Результаты и обсуждение.** Предложены следующие модификации к традиционным методикам культивирования и фиксации амниоцитов.

1. Устранен предварительный этап обработки амниотической жидкости перед постановкой ее в культуру — центрифугирование. Благодаря этому удалось снизить уровень травматизма эмбриональных клеток и, следовательно, повысить количество прикрепленных к субстрату амниоцитов.

2. На протяжении всего времени культивирования лишь дважды меняли питательную смесь. Первый раз на 5-е сут после постановки культуры, поскольку более ранняя смена, описываемая в ряде классических методик [6—8], нежелательна вследствие того, что лишь по истечении вышесказанного срока расходуется весь набор питательных веществ в культуральной смеси. Второй раз — за 16—18 ч до начала фиксации. Данное условие позволяет синхронизировать мейотические деления амниоцитов, поэтому количество метафаз на готовых препаратах увеличивается.

3. Для культивирования амниоцитов использовали эмбриональную телячью сыворотку и синтетические питательные среды. Культуральную смесь готовили непосредственно перед постановкой культуры. Самостоятельное производство эмбриональной телячьей сыворотки позволяет избежать нарушений температурного режима. Качество культу-

рального субстрата повышается также за счет использования комбинированной питательной смеси (среды RPMI-1640, Ham's F-10, IMDM, Ham's F-12) и комплекса витаминов и аминокислот.

4. В состав культуральных сред вводится буферный раствор (HEPES) для поддержания оптимальной кислотности питательной смеси (7,2—7,4). В этой связи нет необходимости использовать дорогостоящий CO<sub>2</sub>-инкубатор, как предполагается традиционными методиками.

Итак, при использовании всех вышеприведенных модификаций время культивирования амниоцитов сократилось до 8—12 сут. По истечении 8 сут на дне культуральных флаконов просматриваются 5—6 хорошо сформированных колоний (такая культура уже пригодна для фиксации), а через 12 сут формируется сплошной клеточный монослой. При использовании классической методики получение клеточного материала, необходимого для фиксации, достигается лишь за 15—21-е сут.

Таким образом, усовершенствованная методика позволяет снизить сроки культивирования амниоцитов и в случае необходимости проводить цитогенетическую дородовую диагностику плода при больших сроках беременности — 23—25 недель. Кроме того, при использовании модифицированной методики повышается качество хромосомных препаратов, а количество метафаз на одном стекле увеличивается до 30—50, в отличие от стандартной методики, позволяющей получить 13—15 пластинок, доступных для анализа.

При использовании общепринятой методики культивирования в ряде случаев необходимо повторение амниоцентезов из-за отсутствия роста культуры, что может приводить к серьезным осложнениям, самопроизвольному прерыванию беременности [2, 3].

В Донецком межобластном медико-генетическом центре инвазивные исследования с использованием предложенной методики проведены более чем для 1300 женщин. Были выявлены 40 хромосомных патологий плода. Среди них наиболее часто встречаемые: трисомия 21 — 18 случаев; трисомия 18 — 5; синдром Тернера — 3; синдром трипло-Х — 2. Помимо этого, синдромы Клайнфельтера и дупль-У; триплоидия и др. Предложенные модификации культивирования амниотической жидкости

для получения хромосомных препаратов высокого качества могут быть широко использованы в научно-исследовательской и практической работе в цитогенетических лабораториях Украины.

С. Б. Арбузова, Л. А. Хлівна, С. А. Малова

Удосконалена методика культивування та фіксації амніоцитів людини

Резюме

Описано модифікації, запропоновані до класичних методів культивування та фіксації амніоцитів. Удосконалена методика дозволяє скоротити час культивування до 8—12 днів, збільшити число метафазних пластинок на препаратах, що аналізуються, поліпшити їхню якість.

S. B. Arbuzova, L. A. Khelevnaya, S. A. Malova

Modified methods of cultivation and fixation of human amniocytes

Summary

Modifications offered for classic techniques of cultivation and fixation of amniocytes have been described. The modified technique allows to shorten the time for cultivation till 8—12 days, increase a number of metaphase plates on the analysed preparations and to improve their quality.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Перспективы медицинской генетики / Под ред. Г. П. Бочкова.—М.: Медицина, 1982.—500 с.
2. Кулешиов Н. П., Барцева О. Б., Баранов В. С. и др. Пренатальная цитогенетическая диагностика: результаты исследований в I и II триместрах беременности // Мед. генетика: Теория и практика (Итоги сотрудничества Ин-та мед. генетики АМН СССР и Ин-та акушерства и гинекологии АМН СССР).—М., 1989.—С. 83—91.
3. *Tabor Ann. Genetic amniocentesis — indication and risk // Prenat. Diagn.*—1988.—35, N 6.—P. 520—537.
4. *Mennuti M. T. Prenatal diagnosis — advances bring new challenges // N. Engl. J. Med.*—1989.—230, N 10.—P. 661—663.
5. *Wolstenholm J., Rooney D. E. Confined placental mosaicism, IUGR and adverse pregnancy outcome: a controlled retrospective U. K. collaborative survey // Prenat. Diagn.*—1994.—14, N 5.—P. 345—361.
6. *Jacobson C. B., Barter R. H. Intrauterine diagnosis and management of genetic defects // Amer. J. Obstet. and Gynecol.*—1967.—99, N 6.—P. 796—807.
7. *Nadler H. L. Indications for amniocentesis in the early prenatal detection of genetic disorders. Birth defects // Original articles series.*—1971.—7, N 5.—P. 5—9.
8. *Nelson M. M., Emery A. E. M. Amniotic fluid cell culture // J. Med. Gen.*—1973.—10, N. 1.—P. 19—33.

Поступила в редакцию 03.02.98