

Быстрая пренатальная диагностика наиболее частых числовых аномалий хромосом методом количественной флуоресцентной ПЦР в Беларуси

Осадчук Т.В., Савенко Л.А., Новикова И.В.

ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Республика Беларусь, e-mail: t.asadchuk@gmail.com

В работе представлена разработанная методика ДНК-диагностики наиболее частых хромосомных анеуплоидий, основанная на методе количественной флуоресцентной ПЦР с использованием мультиплексной ПЦР и автоматического капиллярного электрофореза на основе одновременного тестирования 15 микросателлитных маркеров хромосом 13, 18, 21, X, Y. Выполнена ДНК-диагностика 200 образцов от пациентов из группы риска по хромосомной патологии. Числовые аномалии хромосом идентифицированы в 18 случаях (9%), включали трисомию хромосомы 21 (8/200), трисомию хромосомы 18 (5/200), трисомию хромосомы 13 (1/200), триплоидию (3/200), мозаичную форму моносомии хромосомы X (кариотип 45,X[50]/46,XY[5]) (1/200). Результат ДНК-диагностики при стандартном выделении ДНК из амниотической жидкости или ворсин хориона может быть готов через 6 часов после выполнения биопсии или амниоцентеза.

Ключевые слова: анеуплоидия, количественная флуоресцентная ПЦР, пренатальная диагностика

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, примерно 2,5—3% всех новорожденных имеют различные пороки развития, из них около 1% составляют генные болезни, 0,5% — хромосомные болезни и около 2% приходится на врожденные пороки развития, обусловленные разными факторами [1—2].

Диагноз хромосомной патологии ставится после проведения кариотипирования. Метод кариотипирования с дифференциальной окраской хромосом сих пор остается «золотым стандартом» диагностики хромосомных аномалий. Однако существующие ограничения метода не позволяют быстро сделать заключение о наличии хромосомной патологии у плода [3]. Введение в клиническую лабораторную практику молекулярно-генетических методов позволило дополнить стандартный цитогенетический анализ новыми возможностями. Наибольшее распространение получили методы интерфазной флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH-метод), количественной флуоресцентной полимеразной цепной реакции (КФ-ПЦР), мультиплексной лигазной цепной реакции и метод сравнительной геномной гибридизации [4—7].

Метод КФ-ПЦР основан на мультиплексной ПЦР с использованием флуоресцентно-меченых праймеров. Для выявления анеуплоидий исследуют хромосомные области, содержащие полиморфные tandemные повторы. С целью увеличения информативности, как правило, используют 3—4 маркера на каждую хромосому [8]. Метод отличается высокой точностью даже при небольшом количестве материала, позволяет одновременно оценить большое количество образцов.

Целью настоящей работы являлась разработка и внедрение эффективной методики ДНК-диагностики наиболее частых числовых аномалий хромосом человека.

Материалы и методы

В качестве биологического материала использовалась ДНК, выделенная из клеток амниотической жидкости, а также фрагментов мышечной ткани абортированных плодов с различными анеуплоидиями.

При отборе микросателлитных маркеров хромосом 13, 18, 21, X, Y учитывались имеющиеся в литературе данные о размере и количестве аллелей, а также степени гетерозиготности.

Обработка условий получения фрагментов ДНК, включающих последовательности микросателлитных маркеров, проводилась путем подбора состава амплификационной смеси и оптимальных температурно-временных условий проведения ПЦР. Для анализа образцов ДНК в автоматическом анализаторе в ПЦР-продукт вводилась одна из четырех флуоресцентных меток. Для этой цели использованы меченые варианты прямых праймеров. Обработку данных и определение аллелей выполняли с помощью пакета компьютерных программ GENESCAN.

Результаты и обсуждение

Для молекулярно-генетического выявления анеуплоидий использовали метод КФ-ПЦР. Данным методом исследовали хромосомные области, содержащие полиморфные tandemные повторы. Для определения уровня гетерозиготности и информативности микросателлит-

ных маркеров анализ исследуемых фрагментов ДНК выполнен в 50 образцах (100 хромосом) контрольной выборки. В результате проведенного исследования отобраны маркеры хромосомы 21: D21S11, D21S1411, D21S1435; хромосомы 13: D13S252, D13S305, D13S325, D13S634; хромосомы 18: D18S386, D18S390, D18S391, D18S535; хромосомы X: DXS1187, DXS981; хромосомы Y: AMEL и DYS448. Все маркеры обладают высоким уровнем гетерозиготности (от 62% до 96%) и могут быть эффективно использованы для определения наиболее распространенных анеуплоидий. На основании проведенного исследования разработан протокол ДНК-диагностики наиболее частых хромосомных анеуплоидий с использованием мультиплексной ПЦР, включающей в себя одновременное исследование 15 микросателлитных маркеров хромосом 13, 18, 21, X, Y, и автоматического капиллярного электрофореза. Полученные данные анализируют, определяя количество аллелей микросателлитных маркеров соответствующих хромосом на электрофореграмме.

Разработанный протокол был протестирован в группе плодов, абортированных после установления хромосомной патологии по данным цитогенетического анализа (29 образцов с различными анеуплоидиями и трипло-

идией). Диагнозы синдромов Дауна, Эдвардса, Патау, Тернера, Клайнфельтера и триплоидии были точно верифицированы во всех образцах: при диагностике трисомии хромосом 13, 18, 21 или триплоидии наблюдалось присутствие трех пиков почти равной высоты или присутствие двух пиков с соотношением интенсивности соответствующей дозовому эффекту. При тестировании образцов с синдромом Тернера наблюдалось только по одному аллелю для маркеров хромосомы X, а при синдроме Клайнфельтера — сигнал от двух хромосом X и хромосомы Y.

Также с применением разработанного протокола (в качестве дополнительного метода) была протестирована группа из 200 беременных женщин, имеющих риск хромосомной патологии у плода. Числовые аномалии хромосом были идентифицированы в 18 случаях (9%), включали трисомию хромосомы 21 (8/200), трисомию хромосомы 18 (5/200), трисомию хромосомы 13 (1/200), триплоидию (3/200), мозаичную форму моносомии хромосомы X (кариотип 45,X[50]/46,XY[5]) (1/200). Во всех случаях диагнозов, установленный при молекулярно-генетическом анализе, был подтвержден цитогенетически.

Результаты диагностики представлены на рис. 1 и 2.

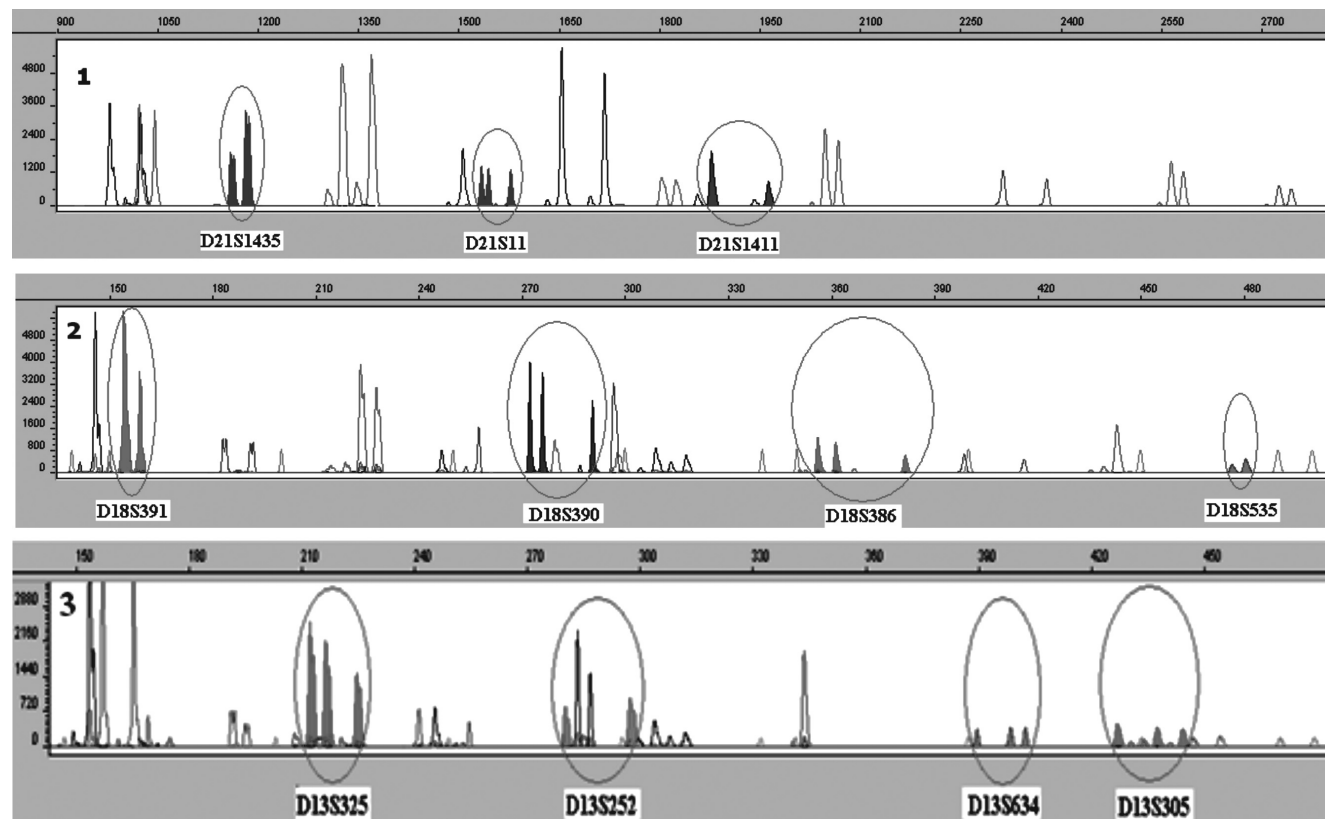


Рис. 1. Варианты электрофореграмм с различными анеуплоидиями: 1 — трисомия хромосомы 21; 2 — трисомия хромосомы 18; 3 — трисомия хромосомы 13.

Проанализированы временные характеристики разработанного протокола:

- выделение ДНК из биологического материала (кровь, ткань, клетки амниотической жидкости) — 120 мин;
- подготовка и проведение амплификации участков ДНК, содержащих микросателлитные маркеры — 180 мин;
- подготовка и анализ полученной смеси фрагментов методом автоматического капиллярного электрофореза — 45 мин.

Таким образом, результат ДНК-диагностики числовых аномалий хромосом человека при применении технологии КФ-ПЦР может быть получен через 6 часов после выполнения биопсии или амниоцентеза.

При интерпретации результатов следует учитывать, что:

- метод КФ-ПЦР может использоваться в дополнение к другим методам пренатальной диагностики;
- результаты анализа дают информацию о состоянии только определенного локуса, и этот метод не может заменить полный хромосомный анализ;
- результаты, соответствующие моносомии X, когда все полиморфные маркеры содержат только один аллельный пик, и при этом отсутствуют последовательности Y-хромосомы, могут представлять случаи нормального женского генотипа, гомозиготного по всем использованным маркерам. Поэтому такие результаты должны быть подтверждены другой методикой либо интерпретированы как соответствующие моносомии X, но с вероятностью наличия у пациента нормального женского генотипа;

• используемый метод позволяет идентифицировать увеличение или уменьшение количества хромосомного материала, но не объясняет тип перестройки хромосом;

• при наличии в кариотипе частичных трисомий или моносомий по исследуемым хромосомам, возникающих в результате различных структурных перестроек, данная патология может быть не идентифицирована, если используемые маркеры не попадают в вовлеченный в перестройку locus;

• при наличии в кариотипе мозаицизма электрофореграмма может иметь нестандартный вид и в некоторых ситуациях не получит интерпретации. Для выявления такой патологии будут требоваться другие методы исследования.

Заключение

На основании проведенного исследования разработана методика ДНК-диагностики наиболее частых числовых аномалий хромосом человека с использованием мультиплексной ПЦР и автоматического капиллярного электрофореза. Разработанный протокол отличается высокой точностью даже при небольшом количестве биологического материала, а совпадение результатов ДНК-анализа с данными кариотипирования зафиксировано в 100% случаев.

Показано, что результат ДНК-диагностики числовых аномалий хромосом человека при стандартном выделении ДНК из амниотической жидкости или ворсин хориона и применении технологии КФ-ПЦР может быть получен через 6 часов после выполнения биопсии или амниоцентеза.

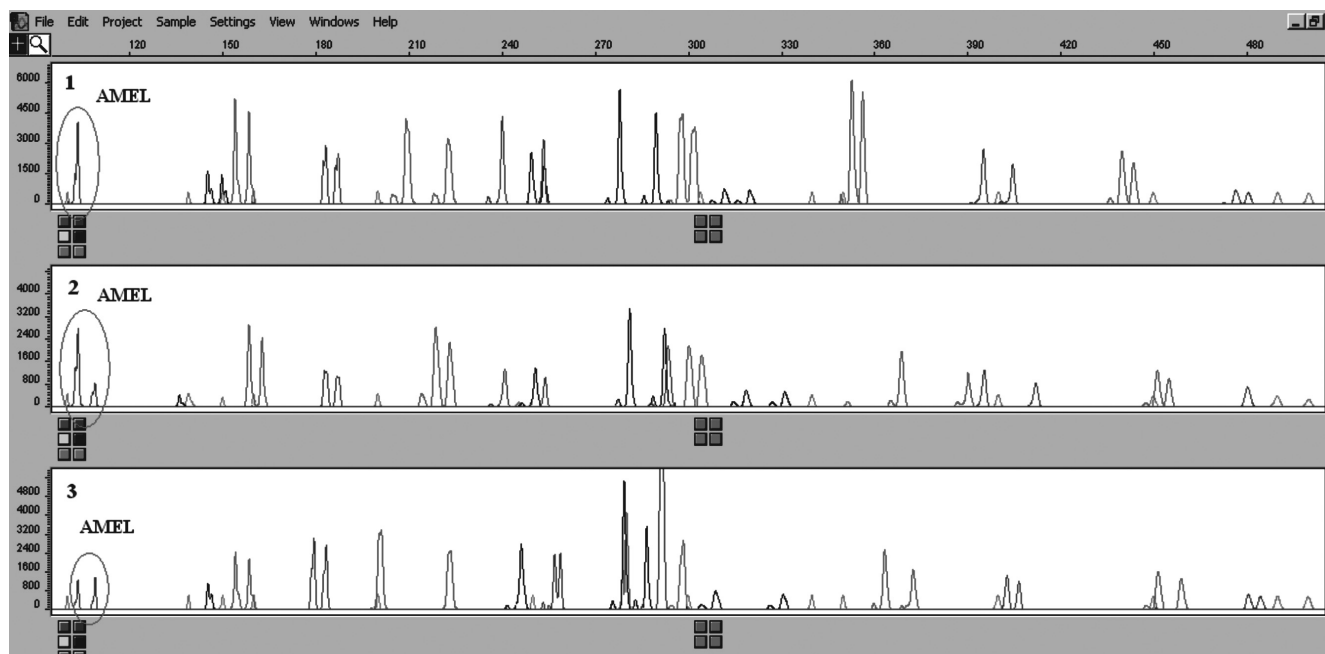


Рис. 2. Варианты электрофореграмм по маркеру AMEL:

1 — норма, женский пол (один пик); 2 — мозаичная форма моносомии хромосомы X (соотношение пиков 3:1); 3 — норма, мужской пол (два пика — один с хромосомы X, второй с хромосомы Y).

Список литературы

1. Бочков НП. Клиническая генетика: Учебник. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.:ГЭОТАР-МЕД. 2001;448с.
2. Новиков ПВ. ДНК-тестирование: моногенные и мультифакториальные болезни. Русский медицинский журнал. 2011;(12):794-800.
3. Никитина ВА, Воскобоева ЕЮ, Калашникова ЕА. Молекулярно-генетические методы пренатальной диагностики анеуплоидий. Российский вестник акушера-гинеколога. 2009;5:35-38.
4. Шилова НВ, Золотухина ТВ. Интерфазная флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) в диагностике числовых хромосомных aberrаций. Медицинская генетика. 2007;6(10):53-58.
5. Dudarewicz L, Holzgreve W, Jezirowska A, et al. Molecular methods for rapid detection of aneuploidy. J Appl Genet. 2005;46(2):207-215.
6. Slater HR, Bruno DL, Ren H, et al. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). J Med Genet. 2003;40:907-912.
7. Shaffer LG, Bui T-H. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2007;145C(1):87-98.
8. Schmidt W, Jenderny J, Hecher K. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. Mol. Hum. Reproduction. 2000;6(9):855-860.

Rapid prenatal diagnostics of the most frequent numerical abnormalities of human chromosomes using quantitative fluorescent PCR analysis in Belarus

Asadchuk T.V., Savenko L.A., Novikova I.V.

Republican Scientific and Practical Centre «Mother and Child», Minsk, Belarus; e-mail: t.asadchuk@gmail.com

We present the developed method of DNA-diagnostics of the most common chromosomal aneuploidies based on the method of quantitative fluorescent PCR using multiplex PCR and automated capillary electrophoresis on the basis of simultaneous testing of 15 microsatellite markers of chromosomes 13, 18, 21, X, Y. There was completed DNA-diagnostics of 200 samples from patients having risk for chromosomal aberrations. Numerical chromosomal abnormalities were identified in 18 cases (9%) and included trisomy of chromosome 21 (8/200), trisomy of chromosome 18 (5/200), trisomy of chromosome 13 (1/200), triploidy (3/200), mosaic form of chromosome X monosomy (karyotype 45,X[50]/46,XY[5]) (1/200). The result of DNA-diagnostics with standard DNA isolation from amniotic fluid or chorionic villi can be ready in 6 hours after biopsy or amniocentesis.

Key words: aneuploidy, quantitative fluorescent PCR, prenatal diagnostics