

Результаты использования медицинской технологии определения наиболее частых анеуплоидий методом многолокусной количественной флуоресцентной ПЦР*

Стрельников В.В.¹, Кузнецова Е.Б.^{1,2}, Иванов М.А.², Землякова В.В.², Залетаев Д.В.^{1,2}

¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115478, г.Москва, ул. Москворечье, д. 1, e-mail: vstrel@list.ru

² — Государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, 119991, г.Москва, ул. Трубецкая, д.8, e-mail: zalnem@mail.ru

Хромосомные аномалии являются частой причиной невынашивания беременности или в случае, если изменения кариотипа совместимы с жизнью, рождения детей с тяжелыми пороками развития. Хромосомное исследование при неразвивающейся беременности дает возможность установить причину потери беременности и провести объективное консультирование супружеской пары. В настоящее время для выявления нарушений кариотипа наряду со стандартным метафазным анализом используются методы сравнительной геномной гибридизации, интерфазного FISH-анализа, количественной флуоресцентной ПЦР и мультиплексной лигазной реакции. Преимуществом методов, основанных на количественной флуоресцентной ПЦР, является их быстрота, экономичность и отсутствие жестких требований к исследуемому материалу. В работе представлены результаты ДНК-диагностики 1239 внутриутробно погибших зародышей с использованием медицинской технологии, представляющей собой эффективный экспресс-метод выявления количественных аномалий генетического материала посредством амплификации последовательностей высокополиморфных микросателлитных локусов ДНК с флуоресцентно мечеными олигонуклеотидными праймерами. В диагностическую панель включены восемь хромосом, числовые аномалии которых наиболее часто встречаются в абортном материале, а также приводят к рождению детей с тяжелыми пороками развития. В группе внутриутробно погибших зародышей нарушения хромосомного набора обнаружены в 418/1239 образцах (34%). Наиболее частым типом хромосомных аномалий явились трисомии по исследуемым аутосомам, совокупная частота которых составила 62,7% (262 образца) и полные триплоидии — 22% (93 образца). Среди трисомий преобладали нарушения по хромосомам 16 и 22 (102 и 64 случая соответственно). Моносомии по аутосомам были представлены незначительно, их суммарная частота составила 4%. Моносомия X-хромосомы была выявлена в 28 случаях (6,7%). В 14 образцах были определены сочетанные трисомии по двум аутосомам.

Ключевые слова: невынашивание беременности, хромосомные аномалии, анеуплоидии, количественная флуоресцентная ПЦР

Введение

Хромосомные аномалии часто возникают в ходе гаметогенеза и раннего эмбрионального развития человека и являются причиной невынашивания беременности или, в случае, если изменения кариотипа совместимы с жизнью, рождения детей с тяжелыми пороками развития. Наиболее распространенными нарушениями, приводящими к ранней эмбриональной летальности, являются числовые хромосомные аномалии — анеуплоидии (трисомии или моносомии), а также полиплоидии (триплоидии и тетраплоидии). Подобные патологии кариотипа наблюдаются примерно в 35—70% случаев спонтанного прерывания беременности [1]. У новорожденных с наибольшей частотой встречаются синдром Дауна (1:700 рождений), синдром Шерешевского—Тернера (1:2000), синдром Эдвардса (1:10000), синдром Патау (1:7000—14000). Причиной числовых хромосомных аномалий являются нарушения сегрегации хромосом в гаметам родителей, в соматических клетках эмбриона на начальных этапах развития, а также ошибки оплодотворения.

Эффективная диагностика хромосомных нарушений плода является незаменимым инструментом в современной акушерско-гинекологической практике. Выявление патологических изменений кариотипа на ранних сроках беременности позволяет предупредить рождение детей с тяжелой патологией. В то же время, хромосомное исследование при неразвивающейся беременности (в рамках комплексного лабораторного анализа) дает возможность установить причину потери беременности и провести объективное консультирование супружеской пары. На сегодняшний день существует целый ряд методов, позволяющих выявлять нарушения кариотипа. Наряду со стандартным метафазным анализом, используются методы, основанные на применении сравнительной геномной гибридизации, интерфазного FISH-анализа, количественной флуоресцентной ПЦР (КФ-ПЦР) и мультиплексной лигазной реакции [2]. Активное внедрение молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических технологий обусловлено с одной стороны определенными ограничениями цитогенетического исследования

* Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

абортного материала, в частности, неудачами культивирования клеток, возможной контаминацией материнскими клетками, невозможностью анализа архивных образцов в парафиновых блоках. С другой стороны, применение этих методов в диагностике позволяет значительно сократить сроки исследования.

Несомненным преимуществом методов, основанных на КФ-ПЦР, является их быстрота, экономичность и отсутствие жестких требований к исследуемому материалу, что позволяет рассматривать такие технологии как перспективные способы диагностики анеуплоидий [3, 4].

Материалы и методы

Разработанная медицинская технология может быть применена для исследования ДНК, выделенной из ворсин хориона, клеток амниотической жидкости или пуповинной крови. В качестве референсного материала для исключения контаминации используется периферическая кровь матери. Технология была апробирована на выборке из 1239 образцов ДНК, полученных из тканей внутриутробно погибших зародышей, предоставленных ФГБНУ «МГНЦ» и Клиникой акушерства и гинекологии им. В.Ф.Снегирева при Первом МГМУ им. И.М.Сеченова

Выделение ДНК из тканей и лимфоцитов периферической крови проводили стандартным методом фенол-хлороформной экстракции, после предварительной инкубации образцов при 56°C в буфере с протеиназой К.

Многолокусная количественная флуоресцентная ПЦР (КФ-ПЦР). Для идентификации анеуплоидий использовали три тест-системы, основанные на КФ-ПЦР с олигонуклеотидными праймерами, мечеными флуоресцентными красителями ROX, R6G и 6-FAM. Первая система (M1) включает высоко полиморфные микросателлитные маркеры, позволяющие анализировать хромосомы 13, 18, 21, X и Y (локусы *Amel*, *D13S258*, *D13S634*, *D13S742*, *D18S386*, *D18S391*, *D18S535*, *D21S11*,

D21S1411, *IFNAR*). Вторая система (M2) предназначена для исследования хромосом 14 и 22 (локусы *D14S122*, *D14S127*, *D14S128*, *D22S683*, *D22S691*, *D22S873*). Третья система (M3) — для исследования хромосомы 16 и X-хромосомы (*D16S534*, *D16S476*, *D16S690*, *DXS8377*, *DXS6809*, *DXS6803*).

При формировании панели маркеров предпочтение отдавалось тетра nukлеотидным повторам, амплификация которых дает меньше погрешностей, что облегчает интерпретацию результатов. Для определения пола используется одна пара праймеров, фланкирующих шестинуклеотидную делецию в гене амелогенина, отличающую хромосомы X и Y.

Многолокусную КФ-ПЦР и последующий анализ на генетическом анализаторе проводили отдельно для каждой тест-системы. В качестве контроля контаминации использовали ДНК лейкоцитов периферической крови матери.

ПЦР проводили в 50 мкл однократного буфера для ПЦР следующего состава: 50 mM KCl, 10 mM Трис-НСl (pH 8,4), 2 mM MgCl₂ с добавлением 0,1 мкг геномной ДНК, 0,05 мкМ каждого олигопраймера, 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 1 ед. Taq-полимеразы. Прогревали смесь при 95°C в течение 5 мин и проводили 28 циклов по следующей программе: 95°C — 30 с, 57°C — 1 мин, 72°C — 1 мин 30 с; финальная элонгация 72°C — 5 мин. В случае тест-систем M2 и M3 температура отжига составляет 60°C.

Нуклеотидные последовательности оригинальных олигонуклеотидных праймеров и диапазон длин амплифицируемых фрагментов представлены в табл. 1, 2 и 3.

Анализ продуктов КФ-ПЦР осуществляли на автоматическом генетическом анализаторе ABI PRISM 3100 фирмы Applied Biosystems, США, в соответствии с протоколами производителя и с использованием предоставленного фирмой программного обеспечения (GeneMapper v.3.4). В качестве маркера молекулярного веса ДНК использовали LIZ500 (Applied Biosystems). Рекомендуемое количество образца продукта ПЦР для анализа составляет 1–2 мкл.

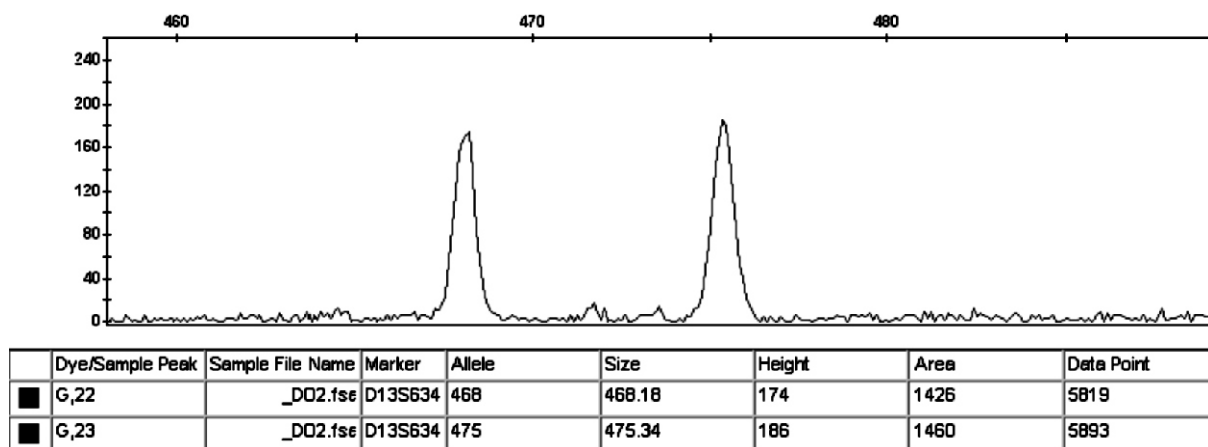


Рис. 1. Фрагмент электрофореграммы продуктов КФ-ПЦР. В таблице указаны точный размер фрагмента (Size), высота (Height) и площадь (Area) анализируемого пика.

Таблица 1

Последовательности праймеров, используемых в системе M1

Маркер	Праймеры	Размер, п.н.	Гетерозиготность
<i>D13S258</i>	F: R6G-TTCAGTAAATACACGGAGTCA R: GAGAGGGAATAAACCAATAAG	170–210	~0,82
<i>D13S742</i>	F: TAGGAATGGAATAGGTTGTA R: R6G-CCCACCTCCAGAGTTCCAAT	260–300	~0,75
<i>D13S634</i>	F: FAM-TCAATAGGATAAATAGACAGA R: TAGGATTCACACCAGTAACCC	380–420	~0,875
<i>D18S535</i>	F: ROX-CAGCAACTTCATGTGACAAA R: CTATTCATCAACTATTTCTGG	380–430	~0,92
<i>D18S391</i>	F: FAM-TCACTCAGCTAATTAAATTCC R: ATGTGAGTTGCTGTATTGAC	270–310	~0,75
<i>D18S386</i>	F: R6G-CCGATCTAGAAGTCATACATT R: TCAGGAGAATCACTTGGAAC	400–440	~0,875
<i>D21S11</i>	F: FAM-TTTCTCAGTCTCCATAAATATGTG R: GATGTTGTATTAGTCAATGTTCTC	225–280	~0,90
<i>D21S1411</i>	F: GGATAAATAGAACATAGGTAG R: ROX-CTCCCAGCCTTCTAAATATTC	256–340	~0,933
<i>IFNAR</i>	F: FAM-GTTCTTCATTTGATCTTAGCCATC R: GTGAGATAACTGGCAAGAAGATAA	450–500	~0,83
<i>AMEL</i>	F: FAM-CCCTGGGCTCTGTAAAGAAATAGTG R: ATCAGAGCTTAACTGGGAAGCTG	X = 104 Y = 110	

Таблица 2

Последовательности праймеров, используемых в системе M2

Маркер	Праймеры	Размер, п.н.	Гетерозиготность
<i>D14S122</i>	F: FAM-CCAGCCTGGGTGAGACTC R: GAGAGGGAATAAACCAATAAG	193–229	~0,85
<i>D14S127</i>	F: R6G-AACTGGGCCTTCTCTCCT R: ACCAACAAGTTCAAAAGCCC	356–383	~0,79
<i>D14S128</i>	F: FAM-TGAGGTTATGCATGTGTGAG R: GCCCCAAAACCTCTCAGAAG	326–389	~0,89
<i>D22S691</i>	F: R6G-TCAAATTGGAGCCTCTTCTG R: GCTCATGTCTCCAAATGGAC	230–270	~0,85
<i>D22S683</i>	F: ROX -AACAACAAACAAACAAACAAACA R: -GGTGGAAATGCCTCATGTAG	170–210	~0,80
<i>D22S873</i>	F: FAM-TACAAAGCCACAAGGGAGT R: GCTCCTCTGAGCACGTTTCT	151–164	~0,78

Таблица 3

Последовательности праймеров, используемых в системе M3

Маркер	Праймеры	Размер, п.н.	Гетерозиготность
<i>D16S534</i>	F: ROX-CAACAAAGCAAGACCCTGTC R: CATCTGCGGTTCTTTCTCTC	294–364	~0,83
<i>D16S2613</i>	F: FAM- TTGGTATCAGAGAATTCCGG R: GCTGAGATCGCACTGCTG	178–199	~0,75
<i>D16S690</i>	F: R6G-GCACAGCTTCCTGATCTGA R: TCACACAACCCACAGAGAA	264–353	~0,875
<i>DXS8377</i>	F: R6j-CACCTTCATGGCTTACCACAG R: GACCTTTGGAAAGCTAGTGT	237–261	~0,85
<i>DXS6809</i>	F: FAM-TGAACCTTCCTAGCTCAGGA R: TCTGGAGAACCAATTTTGC	241–273	~0,80
<i>DXS6803</i>	F: ROX-GAAATGTGCTTTGACAGGAA R: CAAAAAGGGACATATGCTACTT	110–126	~0,78

Количество ПЦР-продукта, образующегося в результате амплификации микросателлитных локусов в КФ-ПЦР, пропорционально количеству матрицы в исходном образце ДНК. Интенсивность свечения, которая, в свою очередь, пропорциональна количеству ПЦР-продукта, может быть оценена по величине площади пика на электрофореграмме. Программное обеспечение, предоставляемое фирмой Applied Biosystems, позволяет представлять результаты анализа продуктов КФ-ПЦР в виде электрофореграммы, сопровождающейся таблицей, содержащей количественные характеристики пиков (рис. 1).

Результаты и обсуждение

Оптимальные критерии интерпретации результатов

У нормальных индивидуумов, гетерозиготных по исследуемому маркеру, наблюдается два пика одинаковой интенсивности (рис. 2А), в случае гомозиготного состояния маркера на электрофореграмме присутствует только один пик (рис. 2Б).

В случае трисомии, наличие трех копий хромосомы может быть определено по образованию трех пиков одинако-

вой интенсивности при амплификации соответствующих хромосомоспецифичных микросателлитных маркеров (рис. 3А). Если две хромосомы имеют аллели с одинаковым числом повторов, в результате КФ-ПЦР образуются два пика, имеющие соотношение площадей 2:1 (рис. 3Б).

Интерпретация результатов основана на использовании критериев, предложенных К.Манн с соавт. [4]. Нормальными считают соотношения доз аллелей каждого из маркеров в пределах от 0,8 до 1,4. Значения соотношения доз выше 1,8, или ниже 0,65 интерпретируют как показатель трисомии, равно, как и наличие трех аллелей одного маркера. Результаты анализа считаются достоверными только в тех случаях, когда, по крайней мере, два маркера на хромосоме находятся в гетерозиготном состоянии. Введение такого критерия необходимо для исключения ложноположительных результатов, связанных с возможным наличием ранее неописанных полиморфизмов исследуемых маркеров, в том числе и в областях отжига праймеров, а также для исключения случаев соматической нестабильности микросателлитных повторов. Диагноз моносомии или изодисомии ставится при наличии всех маркеров на исследуемой хромосоме в гомозиготном состоянии. Дифференцировать эти состояния на основе применяемой технологии можно лишь при условии до-

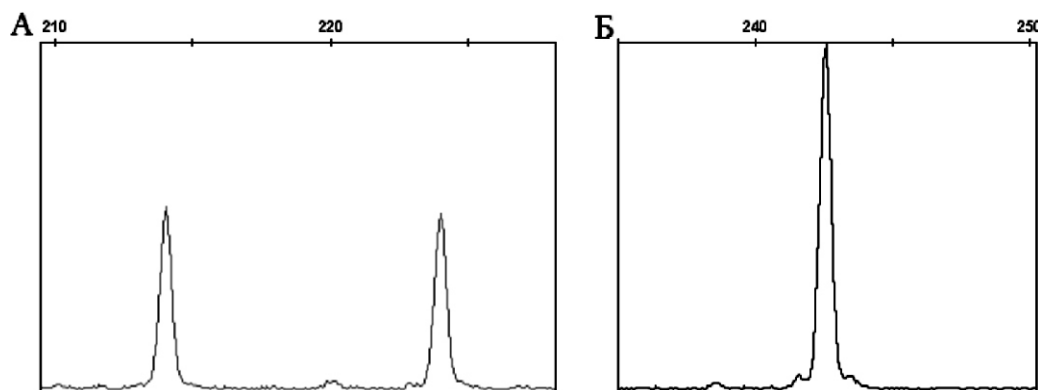


Рис. 2. Пример анализа продуктов амплификации микросателлитного маркера. А — нормальная гетерозигота, соотношение пиков 1:1, Б — гомозиготное состояние маркера.

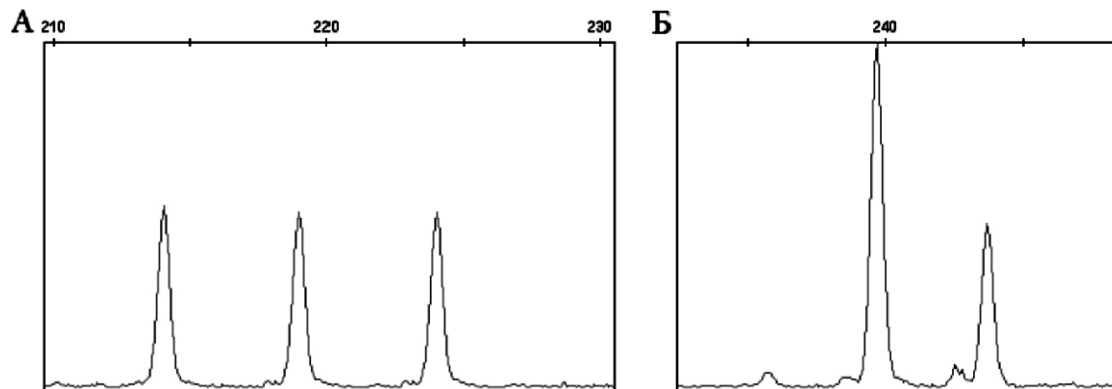


Рис. 3. Пример анализа продуктов амплификации микросателлитного маркера при трисомии. А — образец с трисомией, имеющий три пика с соотношением 1:1:1, Б — образец в трисомии, характеризующийся наличием двух пиков, имеющих соотношение 2:1.

полнительного генотипирования родителей. Набор праймеров, выбранных для определения пола, позволяет также выявлять некоторые численные аномалии половых хромосом (варианты XXУ, ХУУ и другие, связанные с дисбалансом, обусловленным дополнительными хромосомами Х или Y). Выявление трисомий по всем исследуемым хромосомам позволяет предположить наличие триплоидии в анализируемом образце.

Результаты использования медицинской технологии

Представленная технология была использована авторами преимущественно для установления причин развивающейся беременности.

В группе внутриутробно погибших зародышей нарушения хромосомного набора были обнаружены в 418/1239 образцах (34%). Полный спектр выявленных нарушений представлен на диаграмме (рис. 4).

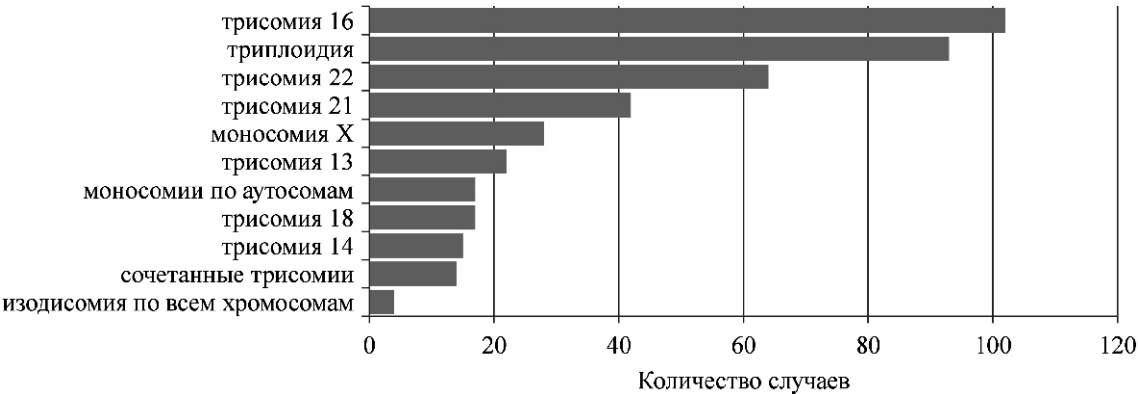


Рис. 4. Спектр хромосомных нарушений, диагностированных методом мультилокусной КФ-ПЦР в группе внутриутробно погибших зародышей.

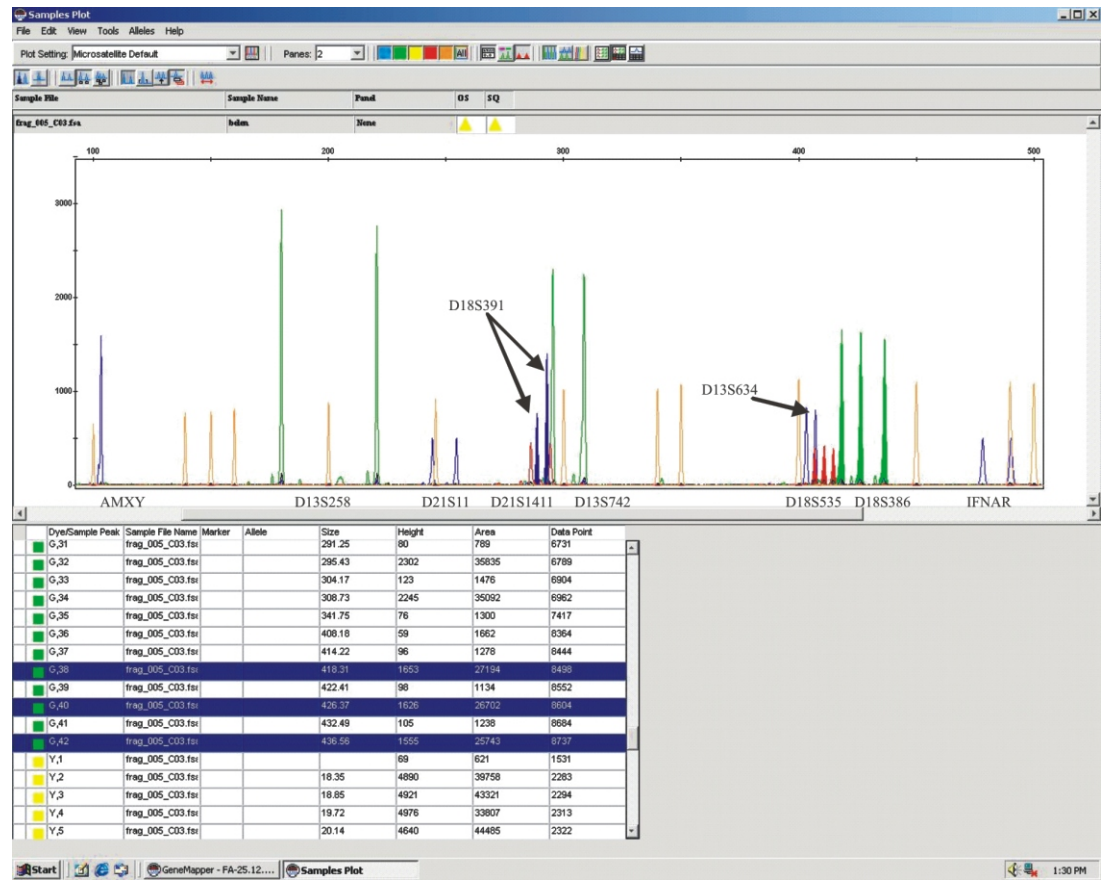


Рис. 5. Фрагментный анализ продуктов многолокусной КФ-ПЦР (цветом выделены пики, отражающие хромосомный дисбаланс). Эмбрион женского пола с трисомией 18. Трисомия подтверждена наличием трех аллелей для локусов D18S535, D18S386 и аллельного дисбаланса с соотношением доз выше 1,8 для локуса D18S391.

Наиболее частым типом хромосомных аномалий являлись трисомии по исследуемым аутосомам, совокупная частота которых составила 62,7% (262 образца) и триплоидии — 22% (93 образца). Примеры выявления трисомий с использованием предложенной медицинской технологии показаны на рис. 5 и 6.

Среди трисомий преобладали нарушения по хромосомам 16 и 22 (102 и 64 случая соответственно). Пример выявления трисомии 16 показан на рис. 7.

Моносомии по аутосомам были представлены незначительно, суммарная частота этих нарушений составила 4%. Тем не менее, моносомия по каждой из исследуемых хромосом встречалась хотя бы один раз: по хромосоме 21 — 7 случаев, по хромосоме 18 — 5, по хромосоме 13 — 2, по хромосомам 14, 16 и 22 — по 1 случаю. Моносомия X-хромосомы была выявлена в 28 случаях (6,7%). В 14 образцах были определены двойные трисомии (рис. 8).

В четырех случаях результаты анализа продуктов КФ-ПЦР продемонстрировали гомозиготное состояние

всех исследуемых маркеров, что позволило нам предположить наличие в этих образцах изодисомии по всем хромосомам (рис. 9). Такое состояние кариотипа можно наблюдать в случае полного пузырного заноса, что было подтверждено клиническими данными в описываемых случаях. При наличии генетических образцов родителей используемый метод позволяет дифференцировать все варианты как полного, так и неполного пузырного заноса, в том числе полный пузырный занос в результате диспермного оплодотворения с утратой материнского пронуклеуса. Установление точной генетической природы пузырного заноса позволяет определить тактику врачебного наблюдения пациентки для предотвращения осложнений, в частности, возникновения трофобластических опухолей.

Обсуждение результатов

Предложенная медицинская технология представляет собой эффективный экспресс-метод выявления ко-

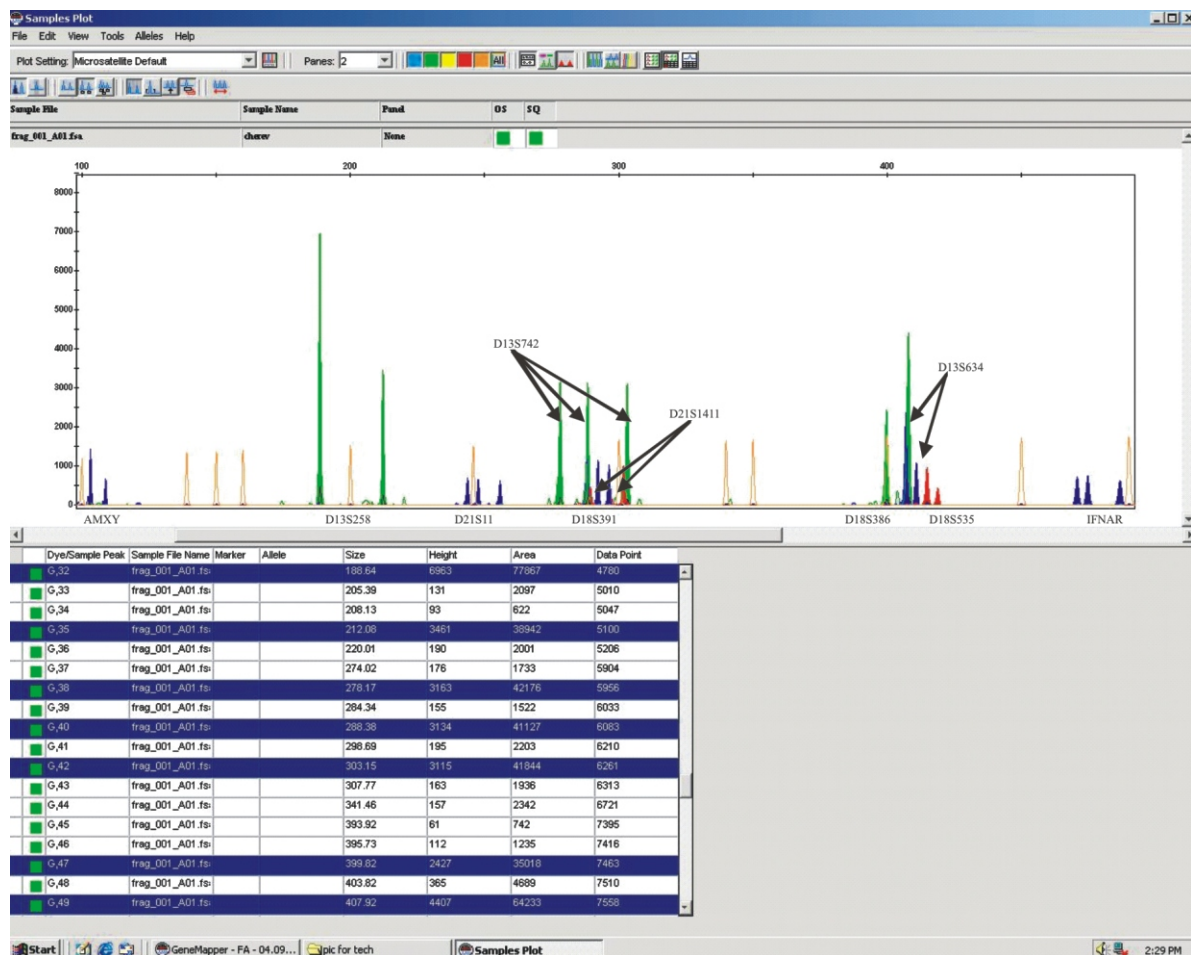


Рис. 6. Фрагментный анализ продуктов многолокусной КФ-ПЦР (цветом выделены пики, отражающие хромосомный дисбаланс). Эмбрион мужского пола с триплоидией. Подтверждением является детекция трех аллелей STR-маркера для локусов D21S11, D13S742, D18S391, IFNAR и аллельного дисбаланса с соотношением доз выше 1,8 для локусов AMXY, D13S258, D13S634, D21S1411, D18S386 и D18S535.

личественных аномалий генетического материала посредством амплификации последовательностей высокополиморфных микросателлитных локусов ДНК с флуоресцентно мечеными олигонуклеотидными праймерами. Впервые аналогичный подход был применен для исследования патологии кариотипа абортусов Diego-Alvarez et al. [7]. Данные этой и ряда последующих работ показали высокую (свыше 90%) сходимость результатов КФ-ПЦР и стандартного цитогенетического исследования [8, 9]. При этом доля неудач классического кариотипирования варьирует от 20 до 40%, в то время как результативность КФ-ПЦР приближается к 100% [10, 11]. В работах Moftah с соавт. (2013), Donaghue с соавт. (2009), в которых проводилось сравнение методов, указывается 100% чувствительность и специфичность КФ-ПЦР применительно к немозаичным случаям нарушений копийности исследуемых хромосом [12, 13]. Zou с соавт. (2008), сообщает о 95%-ной сходимости результатов кариотипирования и КФ-ПЦР [8]. Случаи несоответствия результатов двух используемых методов демонстрировали как обнаружение методом КФ-ПЦР

анеуплоидий в образцах, имеющих нормальный женский кариотип по данным метафазного анализа, так и, напротив, выявление патологии при кариотипировании образцов, определенных как нормальные женщины по КФ-ПЦР. Авторы [7] полагают, что подобная ситуация объясняется контаминацией образцов материнскими клетками и различным происхождением образцов тканей, направленных для проведения каждого из исследований.

На основании анализа цитогенетических исследований, в диагностическую панель включены восемь хромосом, числовые аномалии которых наиболее часто встречаются в абортивном материале, а также приводят к рождению детей с тяжелыми пороками развития. Использование не менее трех высокополиморфных микросателлитных маркеров на каждую анализируемую хромосому позволяет избежать ложноположительных и ложноотрицательных результатов, которые могут являться следствием преимущественной амплификации одного из аллелей, контаминации и малой информативности ДНК-маркера [6].

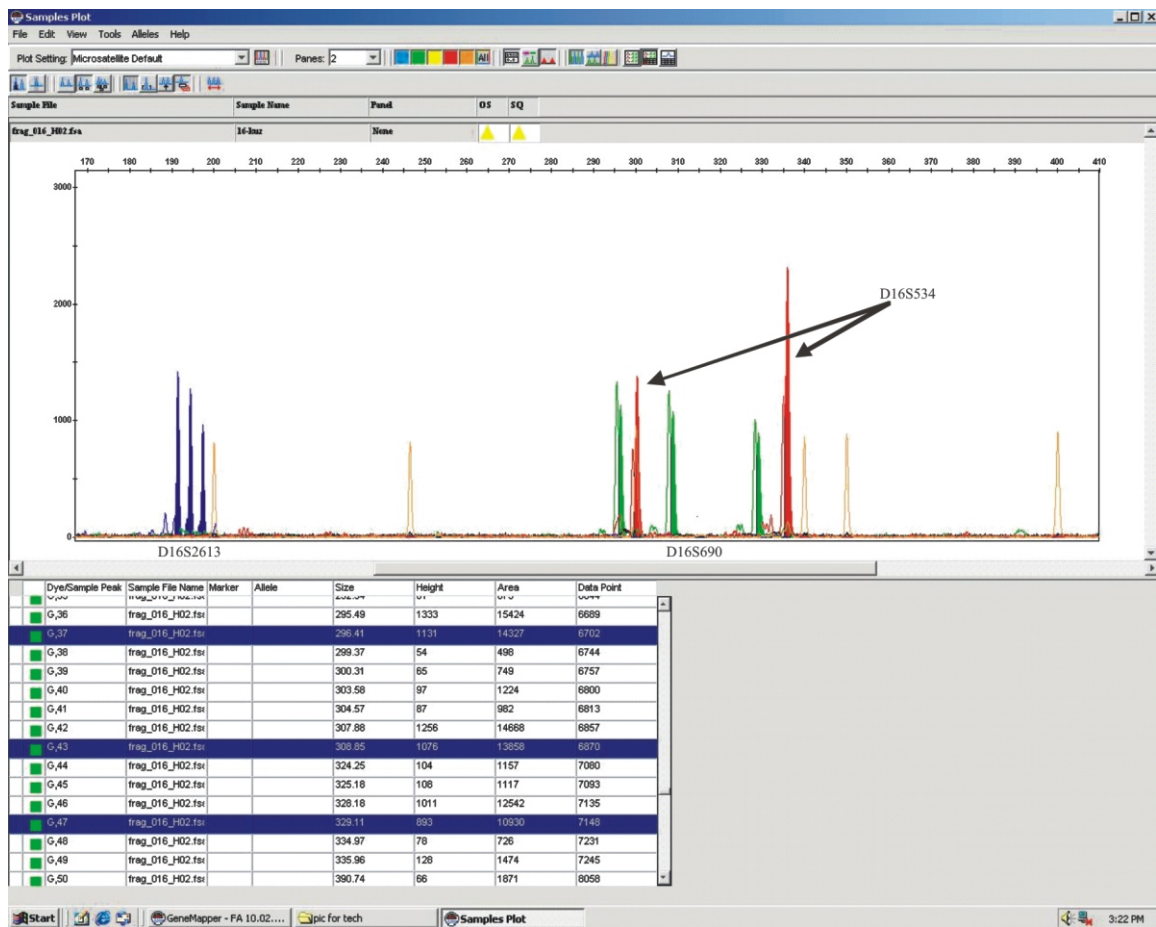


Рис. 7. Фрагментный анализ продуктов многолокусной КФ-ПЦР (цветом выделены пики, отражающие хромосомный дисбаланс). Трисомия хромосомы 16 подтверждена наличием трех аллелей для локусов D16S2613, D16S690 и аллельного дисбаланса с соотношением доз выше 1,8 для локуса D16S534.

Выявленная нами частота анеуплоидий при невынашивании беременности и спектр хромосомных нарушений, в целом, согласуется с данными других исследовательских методов, в том числе, КФ-ПЦР [1, 5, 7, 11, 14, 15]. Несколько меньший процент выявления патологий кариотипа в нашей работе может быть обусловлен тем, что исследование проводилось выборочно для ряда хромосом, анеуплоидии по которым наиболее часто выявляются при неразвивающейся беременности, оставляя за рамками иные варианты хромосомной патологии. Кроме того, значительную группу образцов составили эмбрионы, остановившиеся в развитии на 9–12 неделе гестации, при этом по литературным данным наибольшая частота хромосомных нарушений (около 70%) определяется у эмбрионов, погибших до 6 недель беременности, тогда как у плодов, погибших после 10 недель, анеуплоидии выявляются с частотой около 5%.

Расчетная информативность выбранной нами панели микросателлитных маркеров для каждой хромосомы превышает 99%. Это означает, что все три маркера могут

оказаться в гомозиготном (неинформативном) состоянии у любого случайно отобранного пациента с вероятностью менее 1%.

Критерии анализа результатов КФ-ПЦР допускают однозначную интерпретацию результатов только в случаях информативности как минимум двух маркеров. В нашей панели микросателлитных маркеров расчетная минимальная информативность любых двух маркеров превышает 98%, что теоретически не позволяет проводить достоверную диагностику менее чем для 2% пациентов.

В проведенном нами исследовании действительные значения гетерозиготности для выбранных маркеров на исследуемых хромосомах составили от 87% до 100%. Информативность панели по крайней мере по одному маркеру составила 100%, вероятность присутствия 2-х маркеров в гетерозиготном состоянии — не менее 99%. Информативность системы из 3-х микросателлитных полиморфизмов для каждой хромосомы оказалась удовлетворительной во всех случаях, что не потребовало использования дополнительных маркеров.

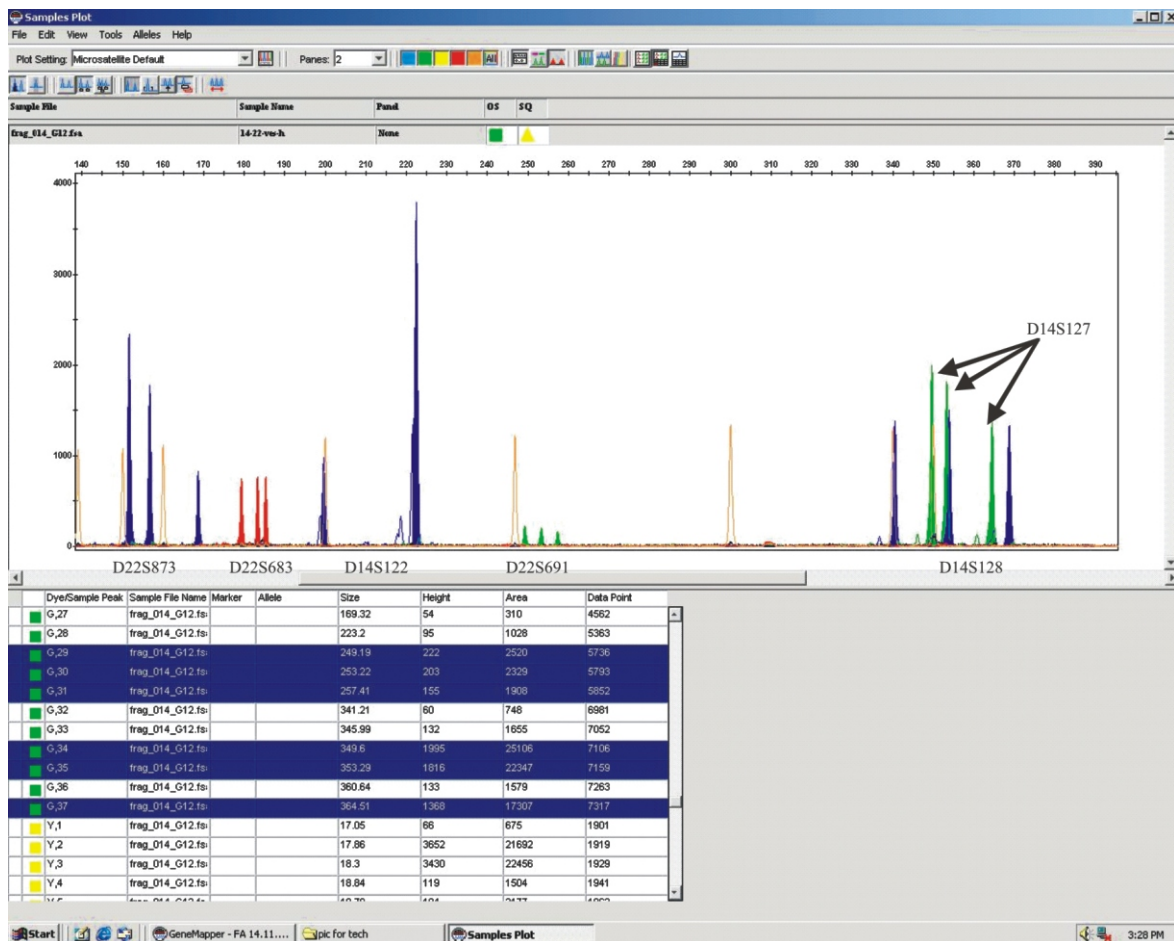


Рис. 8. Фрагментный анализ продуктов многопозонной КФ-ПЦР. (цветом выделены пики, отражающие хромосомный дисбаланс). Двойная трисомия хромосом 14 и 22 подтверждена наличием трех аллелей для локусов D22S873, D22S683, D22S691, D14S127, D14S128 и аллельного дисбаланса с соотношением доз выше 1,8 для локуса D14S122.

Таким образом, использованные нами наборы праймеров и условия КФ-ПЦР позволяют эффективно выявлять наиболее клинически значимые анеуплоидии.

Предлагаемая методика имеет ряд существенных преимуществ по сравнению с альтернативными технологиями. Стандартный цитогенетический анализ, являясь высокоинформативным методом выявления анеуплоидий и большинства структурных аномалий, имеет при этом существенное ограничение при использовании его в целях пренатальной диагностики, а именно, сроки проведения исследования. Время, необходимое для получения результата, включает в себя культивирование клеток амниотической жидкости, а также трудоемкую процедуру кариотипирования образцов. Диагностическая ценность метафазного анализа напрямую зависит от квалификации цитогенетика и качества полученных препаратов. В случаях анализа абортивного материала эффективность цитогенетического исследования невысока вследствие низкой пролиферативной активности клеток и сложности получения качественных метафазных препаратов.

Методы, основанные на применении современных молекулярных технологий, позволяют исключить указанные недостатки. На сегодняшний день в клинической практике чаще всего используются методики, основанные на использовании FISH-анализа, метафазной сравнительной геномной гибридизации и КФ-ПЦР. Основными преимуществами мультилокусной количественной флуоресцентной ПЦР являются: существенная дешевизна по сравнению с альтернативными методами, возможность автоматического анализа большого количества образцов за короткое время, высокая точность определения анеуплоидий. Представленная технология может быть осуществлена на очень небольшом количестве биологического материала и одинаково эффективно использоваться для анализа амниотической жидкости, ворсин хориона, плодной и постнатальной крови, а также фиксированных тканей в парафиновых блоках. Кроме того, возможность сравнения генотипа плода с генотипом матери позволяет исключить риск контаминации образца материнскими клетками. Ограничением данной технологии является невозможность

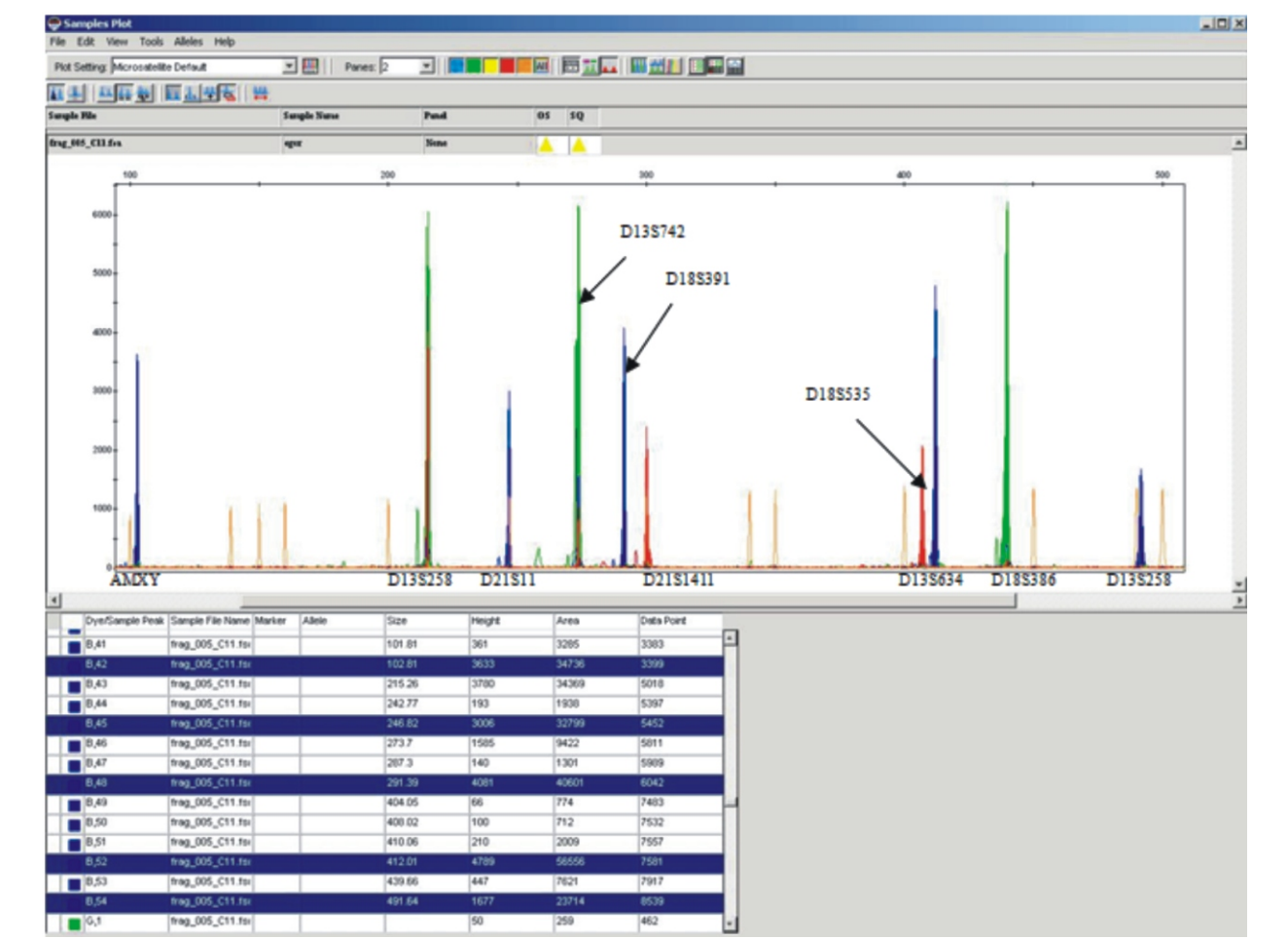


Рис. 9. Фрагментный анализ продуктов многолокусной КФ-ПЦР. Изодисомия по всем исследуемым хромосомам подтверждена детекцией аллелей всех STR-маркеров в гомозиготном состоянии.

обнаружения структурных хромосомных нарушений. Однако, большинство таких изменений относительно редки и ассоциированы с некоторыми фенотипами, которые могут служить показаниями для проведения дополнительных тестов. Существенным недостатком КФ-ПЦР считается ограничение информативности выбранным набором хромосом, но спектр исследуемых хромосом может быть расширен без значительного увеличения стоимости и трудоемкости методики.

В научной литературе обсуждается место КФ-ПЦР среди прочих методов выявления хромосомных аномалий как при анализе материала внутриутробно погибших зародышей, так и в пренатальной и преимплантационной генетической диагностике. Donaghue с соавт. [13] предлагают двухступенчатый алгоритм диагностики генетических причин невынашивания беременности, включающий КФ-ПЦР на первом этапе и (если аномалии не выявлены) субтеломерную MLPA — на втором. Hardy и Hardy [14] суммировали в работе, опубликованной в 2015 г., результаты исследований генетических причин невынашивания в первом триместре беременности, полученные за сорокалетнюю историю изучения. Авторы делают вывод, что любого из применяемых на сегодня лабораторных методов недостаточно для эффективной диагностики, в то время как в совокупности молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические методы способны определить причину невынашивания практически во всех случаях. Авторы считают оптимальным с точки зрения клинической лабораторной диагностики использование всего разнообразия методов, однако не предлагают конкретного алгоритма диагностики. Jenderny [10] также резюмирует, что даже совместное использование методов FISH, MLPA и КФ-ПЦР всего лишь приближает чувствительность диагностики к классическому кариотипированию, которое, по их мнению, остаётся золотым стандартом выявления хромосомных аномалий спонтанных абортусов. В то же время, на основе крупного ретроспективного исследования, проведённого в Германии, тот же автор отмечает, что частоты и типы хромосомных аномалий внутриутробно погибших зародышей, определённых стандартным кариотипированием, не претерпевают заметных изменений в течение последних десятилетий, что позволяет использовать КФ-ПЦР в качестве оптимального дополнительного метода в случаях неудачи культивирования клеток [10].

Существенной характеристикой любого способа диагностики хромосомных аномалий является возможность анализа мозаичных образцов. В нашей работе этот вопрос применительно к КФ-ПЦР экспериментально не исследовался. По данным литературы, КФ-ПЦР эффективна при наличии в образце 23% клеток с трисомией [12]. Есть и оценки, говорящие в пользу КФ-ПЦР как метода анализа мозаичных образцов при сравнении с классическим кариотипированием [9]. В то же время Zou с соавт. (2008) предостерегают о возможности ложных результатов КФ-ПЦР при анализе мозаиков [8]. Недостаточная изученность чувстви-

тельности и специфичности КФ-ПЦР в этом отношении создаёт ограничение диагностической эффективности метода.

Список литературы

1. О.Г. Чиряева, Л.И. Петрова, Н.А. Садик, В.С. Дудкина, А.А. Пендина, И.Д. Федорова, Т.В. Кузнецова, В.С. Баранов. Цитогенетический анализ хориона при неразвивающейся беременности. Журнал акушерства и женских болезней. 2007; (1): 35-45.
2. В.А. Тимошевский, И.Н. Лебедев. Молекулярные методы быстрого кариотипирования в практике пренатальной диагностики клинически значимых анеуплоидий. Сборник «Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике». 2009; (13). «Альфа Виста Н», Новосибирск.
3. Hulten M. A., Dhanjal S. and Pertl B. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. Reproduction. 2003; (126): 279-297.
4. Mann K., Fox S.P., Abbs S., Yau S.C., Scriven P.N., Docherty Z., Ogilvie C.M. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. The Lancet. 2001; (358): 1057-1061.
5. Миньженкова М.Е., Шилова Н.В., Маркова Ж.Г., Козлова Ю.О., Золотухина Т.В. Эффективность различных методов диагностики хромосомных аномалий при репродуктивных потерях // Медицинская генетика. 2014; (2): 25-30.
6. Иванов М.А., Стрельников В.В., Литвиненко М.В., Торганова И.Г., Немцова М.В. Преимплантационная экспресс-диагностика распространенных анеуплоидий на основе количественной флуоресцентной мультилокусной ПЦР. Медицинская генетика. 2005; (5): 194.
7. Diego-Alvarez, D., Garcia-Hoyos, M., Trujillo, M. J., et. al. Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages. Human Reproduction, 2005, 20(5), 1235-1243.
8. Zou, G., Zhang, J., Li, X.W., He, L., He, G., Duan, T. Quantitative fluorescent polymerase chain reaction to detect chromosomal anomalies in spontaneous abortion. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2008, 103(3), 237-240.
9. Donaghue, C., Mann, K., Docherty, Z., Mackie Ogilvie, C. (2005). Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis. Prenatal diagnosis, 25(1), 65-72.
10. Jenderny, J. (2014). Chromosome aberrations in a large series of spontaneous miscarriages in the German population and review of the literature. Molecular cytogenetics, 7(1), 38.
11. McClelland, L. S., Allen, S. K., Larkins, et al. (2011). Implementation and experience of an alternative QF-PCR and MLPA diagnostic strategy to detect chromosomal abnormalities in fetal and neonatal pathology samples. Pediatric and Developmental Pathology, 14(6), 460-468.
12. Mofteh, R., Marzouk, S., El-Kaffash, D., et.al. (2013). QF-PCR as a molecular-based method for autosomal aneuploidies detection. Advances in Reproductive Sciences, 1(03), 21.
13. Donaghue, C., Mann, K., Docherty, Z., Mazzaschi, R., Fear, C., Ogilvie, C. (2010). Combined QF-PCR and MLPA molecular analysis of miscarriage products: an efficient and robust alternative to karyotype analysis. Prenatal diagnosis, 30(2), 133.
14. Hardy, K., Hardy, P. J. (2015). 1st trimester miscarriage: four decades of study. Translational pediatrics, 4(2), 189.
15. van den Berg, M. M., van Maarle, M. C., van Wely, M., Goddijn, M. (2012). Genetics of early miscarriage. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1822(12), 1951-1959.

Results of the use of the medical technology to determine the most frequent aneuploidies by multilocus quantitative fluorescent PCR

Strelnikov V.V.¹, Kuznetsova E.B.^{1,2}, Ivanov M.A.², Zemlyakova V.V.², Zaletaev D.V.^{1,2}

¹ — Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation, 115478, Moskvorechye St, 1, e-mail: vstrel@list.ru

² — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation, 119991, Trubetskaya St, 8, e-mail: zalnem@mail.ru

Chromosomal abnormalities are a common cause of miscarriage, or if karyotype changes are compatible with life, the birth of children with severe developmental disabilities. Cytogenetic analysis in miscarriages makes it possible to establish the cause of pregnancy loss and to conduct an objective counseling of the couple. At the present time to detect abnormalities of the karyotype, along with the standard metaphase analysis methods comparative genomic hybridization, interphase FISH-analysis, quantitative fluorescent PCR and MLPA are used. The advantage of methods based on fluorescence quantitative PCR is their speed, efficiency and lack of strict requirements for the test material. The results of DNA diagnostics in 1239 embryos who died in utero, using new medical technology which is an effective method of rapid quantitative detection of abnormalities of genetic material by amplification of highly polymorphic microsatellite DNA loci with fluorescently labeled oligonucleotide primers. The diagnostic panel includes eight chromosomes for which numerical abnormalities are most often found in the abortive material, as well as lead to the birth of children with severe developmental disabilities. In miscarried embryos chromosomal abnormalities were found in 418/1239 (34%) samples. The most common type of chromosomal abnormality was trisomy of the autosomes, the cumulative incidence of which amounted to 62.7% (262 samples) and full triploidy — 22% (93 samples). Among trisomies abnormalities of 16 and 22 chromosomes were predominant (64 cases and 102 respectively). Autosomal monosomies were rarely found, with the total rate of 4%. Chromosome X monosomy was detected in 28 (6.7%) cases. In 14 samples we identified combined trisomies of two autosomes.

Keywords: miscarriage, chromosomal abnormalities, aneuploidy, quantitative fluorescent PCR