

УДК 576.3:[57.086.862+57.088.1]

UDC 576.3:[57.086.862+57.088.1]

14.00.00 Медицинские науки

Medical sciences

**ВОЗМОЖНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ  
ПОЛИМОРФИЗМОВ И HLA-  
ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ НА  
ОСНОВАНИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО  
МАТЕРИАЛА БЛАСТОМЕРОВ В  
ПРОГРАММАХ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОГО  
СКРИНИНГА**

**THE POSSIBILITY OF THE DETERMINATION  
OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS  
AND HLA-GENOTYPING OF EMBRYONES ON  
THE BASIS OF THE GENETIC MATERIAL OF  
THE BLASTOMERES IN THE PROGRAMS OF  
PREIMPLANTATION SCREENING**

Гудков Георгий Владимирович  
д.м.н., профессор

Gudkov Georgy Vladimirovich  
Dr.Sci.Med., professor

Филиппов Евгений Федорович  
д.м.н., профессор

Filippov Evgeny Fedorovich  
Dr.Sci.Med., professor

Тен Флора Паксуновна  
*ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России,  
кафедра клинической иммунологии, аллергологии и  
лабораторной диагностики ФПК и ППС,  
г. Краснодар, Россия*

Ten Flora Paksunovna  
*GBOU VPO KubGMU,  
Department of clinical immunology, Allergology  
and laboratory diagnostics,  
Krasnodar, Russia*

Крутенко Дмитрий Викторович  
к.б.н.

Krutenko Dmitry Viktorovich  
Cand.Biol.Sci.

Тарасов Ярослав Владимирович  
Биолог

Tarasov Yaroslav Vladimirovich  
Biologist

Курелинок Светлана Александровна  
врач-репродуктолог

Kurelenok Svetlana Alexandrovna  
reproductive physician

Пивень Александр Владимирович  
биолог

Piven Aleksandr Vladimirovich  
Biologist

Демченко Леонид Сергеевич  
биолог  
*Отделение клеточных и репродуктивных  
технологий МБУЗ «Детская городская  
клиническая больница №1»,  
г. Краснодар, Россия*

Demchenko Leonid Sergeevich  
Biologist  
*Department of cellular reproductive technologies of  
"Children's city clinical hospital №1",  
Krasnodar, Russia*

В работе показана возможность расширенного преимплантационного генетического скрининга (ПГС), позволяющего усовершенствовать стратегию отбора эмбрионов, удовлетворяющих не только требованию по отсутствию хромосомных нарушений, но и включающую их дополнительную проверку на предрасположенность к различным заболеваниям, а также выбор эмбриона с наиболее оптимальным HLA гаплотипом в случаях выраженной совместимости родителей по HLA-генам

The research shows the possibility of extended preimplantation genetic screening (PGD) that allows to improve the strategy of selection of embryos that satisfies not only the requirement of the absence of chromosomal abnormalities, but also includes their additional check for predisposition to various diseases, as well as the choice of the embryo with the most optimal HLA haplotype in cases with expressed compatibility of parents for HLA-genes

Ключевые слова: ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ (ПГС), БЛАСТОМЕРЫ, ПОЛНОГЕНОМНАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ (ПГА),

Keywords: PREIMPLANTATION GENETIC SCREENING (PGD), BLASTOMERES, WHOLE GENOMIC AMPLIFICATION (WGA), SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNP), MASS

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ (SNP), МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ, ГЕНЫ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ (МНС)

SPECTROMETRY, GENES OF THE MAIN HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX (MHC).

**Doi: 10.21515/1990-4665-134-008**

Преимплантационный генетический скрининг (ПГС) на основе метода сравнительной геномной гибридизации на микрочипах (Array Comparative Genomic Hybridization, aCGH) служит для выявления цельнохромосомных нарушений у эмбриона, а также крупных внутривхромосомных перестроек [1, 2, 3]. Данный метод не позволяет определять однонуклеотидные полиморфизмы (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), которые могут иметь большое значение в предрасположенности будущего ребенка к различным заболеваниям [4, 5]. Другим отягощающим фактором, после отбора здорового по результатам aCGH эмбриона, может быть неблагоприятная комбинация родительских аллелей по генам главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex, МНС). В случае, когда HLA-антигены матери и отца сходны по большому числу аллелей, эмбрион по данным антигенам будет близок к матери, что не обеспечит необходимую стимуляцию ее иммунной системы и может стать причиной прерывания беременности. Например, установлено, что при наличии общих аллелей по локусу DRB1 у матери и эмбриона риск ранних преждевременных родов в 5 раз выше, чем у пар мать-ребенок, где HLA совместимость по данному локусу отсутствует [6]. По этой причине, при выраженной HLA-совместимости супругов, нормальные по результатам aCGH эмбрионы желательно подвергать дополнительному "сортиingu" с выбором для переноса в процедуре ЭКО тех из них, которые имеют комбинацию HLA аллелей наиболее отличную от гаплотипа матери.

Важным этапом на пути формирования методологических основ ПГС является проведение полногеномной амплификации (ПГА) с

получением библиотеки фрагментов, репрезентативно отражающих геном единичных клеток – бластомеров [7]. Только благодаря успехам последних лет, связанных с разработкой методов ПГА, стало возможным снять ограничения "малых количеств" стартового материала для целей молекулярно-генетического анализа [8]. Современные протоколы ПГА обеспечивают практически 1000-кратное умножение генома отдельных клеток развивающегося зародыша [9], что предоставляет широкую возможность для тестирования различных молекулярно-генетических методов. В этой связи, качество ПГА должно обеспечивать не только проведение аCGH, но и возможность эффективной реализации полимеразно-цепных реакций (ПЦР), лежащих в основе выявления SNP и HLA-генотипирования.

Таким образом, актуальность внедрения расширенного ПГС очевидна, поскольку позволяет усовершенствовать стратегию отбора эмбрионов, удовлетворяющих не только требованию по отсутствию хромосомных нарушений, но и включающую их дополнительную проверку на предрасположенность к различным заболеваниям, а также выбор эмбриона с наиболее оптимальным HLA гаплотипом в случаях выраженной совместимости родителей по HLA-генам.

**Цель:** В ходе процедуры ПГС на основе аCGH изучить возможность применения полногеномной амплификации генетического материала единичных бластомеров для создания репрезентативной ДНК-библиотеки фрагментов, пригодной для определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и HLA-генотипирования эмбрионов на стадии дробления.

### **Материалы и методы**

По программе вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) было обследовано 10 супружеских пар, которые имели показания к

проведению ПГС методом аСГН. Средний возраст женщин составил  $34,4 \pm 5,2$  года (от 26 до 42 лет). Программу ЭКО/ИКСИ проводили по стандартному протоколу. Дополнительными критериями включения пациентов в исследование являлось носительство однонуклеотидных мутаций в генах системы свертывания крови (фактор Ляйдена – F5, метионин-синтаза – MTR, метилентетрагидрофолатредуктаза – MTHFR, метионин-синтаза редуктаза – MTRR), а также высокая совместимость супругов по генам HLA (наличие трех и более совпадений по аллелям генов HLA II класса – DQA, DQB и DRB1).

В результате трансвагинальных пункций фолликулов было получено 85 ооцитов с индивидуальными колебаниями от 4 до 15 (в среднем 8,5 ооцитов на пациентку), среди которых доля ооцитов в стадии метафазы второго деления мейоза (категория МII) составила 76 (89,4%). После выполнения ИКСИ коэффициент нормального оплодотворения составил 90,5%, т.е. всего оплодотворилось 77 ооцитов (по 7,7 на пациентку).

При оценке качества эмбрионов пригодными к биопсии бластомера было признано 35 зигот (класс А), что составило 45,5% от нормально оплодотворенных зигот. Биопсия бластомеров выполнялась на 3-й день культивирования при достижении эмбрионами 6-8 клеточной стадии. В блестящей оболочке эмбриона инфракрасным лазером формировали отверстие при помощи системы лазерной диссекции "Zilos-tk" (Hamilton Thorne, USA). Далее осуществляли захват бластомера пипеткой, который шестикратно отмывали в специальной среде PBS-PVP (1% поливинилпирролидон в фосфатно-солевом буфере) и затем переносили в 0,2 мл пробирку с реагентом для экстракции ДНК. Пробирки центрифугировали и переносили в холодовой штатив для дальнейших манипуляций.

В настоящем исследовании ПГА генетического материала бластомера проводили с использованием набора "PicoPLEX™ WGA Kit"

(Rubicon Genomics, США) на ДНК-амплификаторе "Veriti" (Thermo Fisher Scientific, USA) согласно стандартному протоколу производителя. Контроль качества продуктов ПГА оценивали по результатам электрофореза в 1,5% агарозном геле с помощью системы "ChemiDoc™ XRS+" (Biorad, США). Для последующего исследования отбирались образцы демонстрирующие хорошо различимые, яркие полосы со средним размером амплифицированных фрагментов 400 п.н.

HLA-генотипирование проводили на мультиплексном проточном анализаторе "Luminex-200" (Luminex Corporation, США). В работе использовали наборы реагентов "Lifecodes HLA-DQA/B SSO Typing Kit", "Lifecodes HLA-DRB1 SSO Typing Kit" (Immucor, США). Постановку реакции и анализ результатов проводили согласно стандартному протоколу производителя.

Для исследования однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) использовали времяпролетный масс-спектрометр MALDI-TOF "Autoflex speed T" (Bruker, Германия) и набор реагентов "SNP-экспресс-MS" (Литех, Россия) к следующим SNP: фактор Ляйдена (F5, G1691A R506Q G>A, rs6025) метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR, A223V C677T C>T, rs1801133); метионин-синтаза (MTR, D919G 2756 A>G, rs1805087); метионин-синтаза редуктаза (MTRR, I22M A66G A>G, rs1801394). Все этапы реакции минисеквенирования выполняли согласно протоколу производителя. Продукты минисеквенирования в объеме 0,4 мкл, наносили на мишень ("AnchorChip"), предварительно покрытую матрицей на основе 3-гидроксипиколиновой кислоты. После высушивания мишени с нанесенными образцами ее помещали в масс-спектрометр для регистрации и обработки масс-спектров при помощи стандартного пакета программ "FlexControl", "FlexAnalysis" и "Genotools".

## **Результаты и обсуждение**

### *Полногеномная амплификация*

Доступное для анализа количество геномной ДНК (гДНК) является ключевым фактором, от которого зависит успешность последующего применения многих современных методов молекулярно-генетического анализа. После биопсии blastomera необходимо амплифицировать его гДНК, содержание которой менее 10 пг, что крайне недостаточно для проведения различных методов молекулярной диагностики (секвенирование, микрочипы, генотипирование коротких tandemных повторов, количественная ПЦР и др.). Количество гДНК необходимое для этих методов колеблется от 1 до 100 нг, что соответствует 160-1600 клеткам [7].

Главное требование к продукту ПГА – максимально возможная и пропорциональная репрезентативность всех участков генома единичных клеток. Для этого необходимо создание точек инициации репликации, равномерно разбросанных по всему геному на расстояниях, которые полимераза успеет преодолеть до того, как диссоциирует с матрицы ДНК. Несмотря на разнообразие методов ПГА (DOP-PCR, LA-PCR, MDA, MALBAC и др.) наиболее перспективными для целей ПГС являются две сходные технологии "PicoPlex" и "MALBAC" (Multiple Annealing and Looping-Based Amplification Cycles). Они обеспечивают широкое покрытие генома и достаточно равномерную амплификацию всех его участков за счет наличия квазилинейного этапа предварительной репликации первичного транскрипта амплификации, которая позволяет существенно уменьшить неравномерность воспроизведения гДНК в ходе последующего этапа экспоненциального роста числа ампликонов [9].

Наиболее показательной методикой ПГА, заслуживающей отдельного рассмотрения, является технология MALBAC (рис. 1). Для этих целей разработан специальный праймер, который имеет на 5'-конце одинаковый 27-нуклеотидный "хвост", а на 3'-конце – последовательность

из 8 случайных нуклеотидов. Такие праймеры при низкой температуре (15–20°C) равномерно гибридизуются на протяжении всей матрицы гДНК, а при повышении температуры до 70–75°C начинают репликативно удлиняться с образованием полуампликонов различной длины (0.5–1.5 kb) с единственным "5'-хвостом". Для этих целей используется термостабильная ДНК-полимераза с вытесняющей активностью. Для этих целей разработан специальный праймер, который имеет на 5'-конце одинаковый 27-нуклеотидный "хвост", а на 3'-конце – последовательность из 8 случайных нуклеотидов. Такие праймеры при низкой температуре (15–20°C) равномерно гибридизуются на протяжении всей матрицы гДНК, а при повышении температуры до 70–75°C начинают репликативно удлиняться с образованием полуампликонов различной длины (0.5–1.5 kb) с единственным "5'-хвостом". Для этих целей используется термостабильная ДНК-полимераза с вытесняющей активностью.

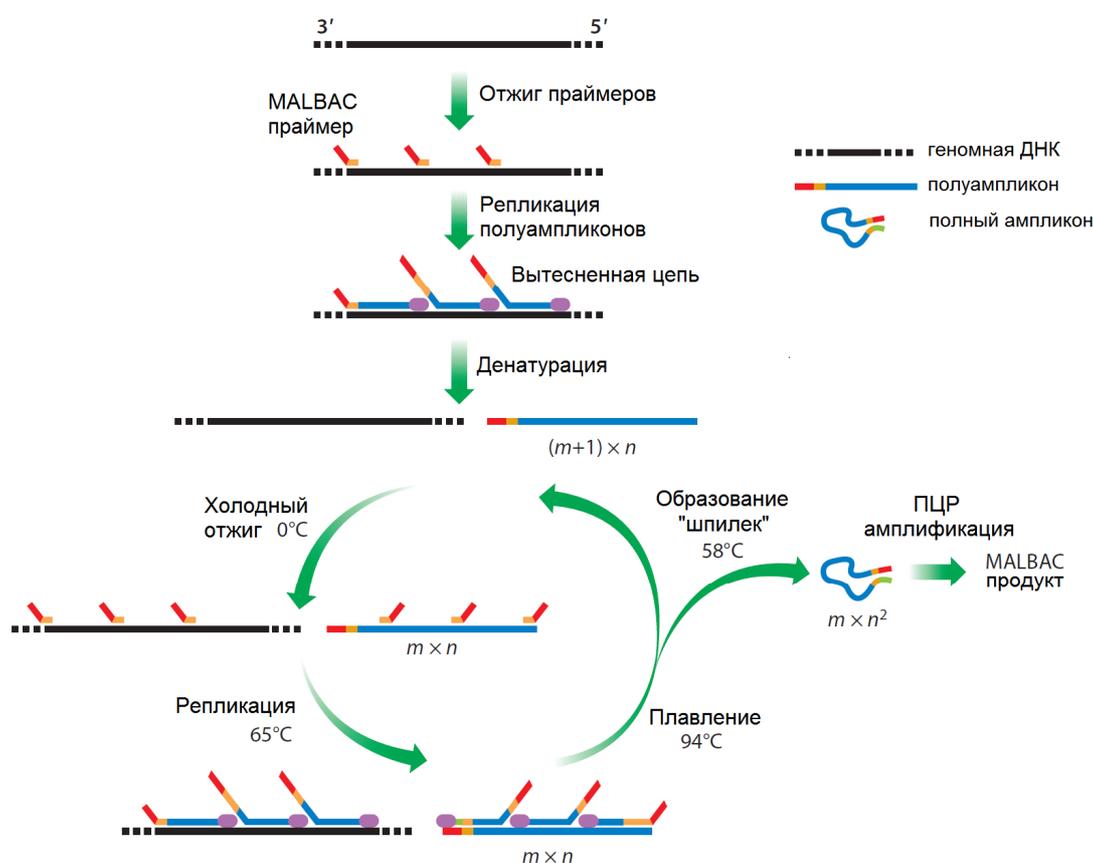


Рис. 1 – Схема, поясняющая технологию MALBAC полногеномной аппликации гДНК [9]. Случайный отжиг праймеров на матрице гДНК и их репликация с линейным ростом числа полуампликонов, а затем и полных ампликонов в ходе температурного цикла. Полные ампликоны замыкаются в шпильки за счет "липких" комплементарных концов, благодаря чему они теряют способность к дальнейшему участию в цикле линейной репликации. На финальном этапе протекает ПЦР с ДНК матрицы полных ампликонов с экспоненциальным ростом их числа.  $m$  – число температурных циклов (8-12);  $n$  – число праймеров гибридизованных с ДНК-матрицей;  $(m + 1) \times n$  – число полуампликонов на  $m$ -цикле;  $m \times n^2$  – число полных ампликонов генерируемых на  $m$ -цикле.

При температуре 95°C полуампликоны денатурируют с матрицы гДНК и далее они служат матрицей для репликации с обратной стороны, в ходе которой формируются полные ампликоны с двумя комплементарными друг другу концами ("хвостами"). При снижении температуры до 58° С "липкие" концы полных ампликонов соединяются с формированием шпилечной структуры (петель ДНК), что предохраняет их от дальнейшей амплификации в следующих циклах (выход из цикла). Число таких циклов повторяется 8-12 раз, что обеспечивает квазILINEЙНЫЙ рост достаточного числа полных ампликонов замкнутых в петли. Предварительная квазилИнейная амплификация в течение небольшого числа циклов является критически важной для следующего этапа ПЦР поскольку позволяет избежать неравномерного воспроизведения гДНК в ходе экспоненциальной амплификации. На этом финальном этапе полные ампликоны сами являются ДНК матрицей для экспоненциальной амплификации в ходе обычной ПЦР. Наличие линейного этапа преамплификации имеет большое значение, что выгодно отличает MALBAC технологию от DOP-PCR и MDA, позволяющее реализовать на ее основе диагностику вариации числа копий генов (Copy Number Variation, CNV) и минимизировать долю ложноотрицательных заключений при определении CNV.

На рис. 2 в качестве примера представлены образцы продуктов ПГА генетического материала бластомеров в 1,5% агарозном геле. Как видно из рисунка, после ПГА в образцах № 1, 2 и 3 выявили недостаточное количество генетического материала, что привело к сомнительным результатам при проведении дальнейших исследований.

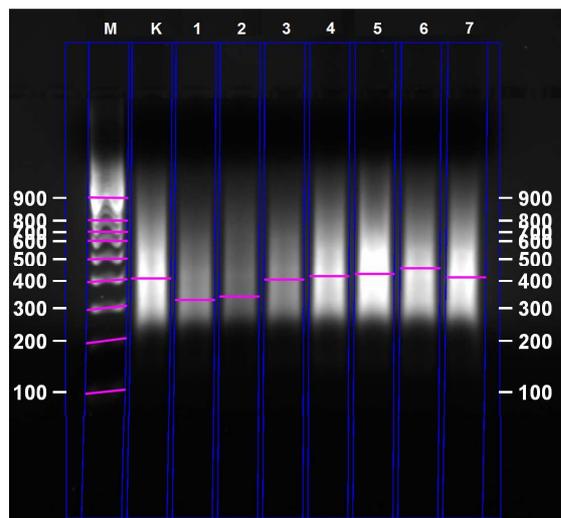


Рис. 2 – Пример визуальной оценки качества ПГА.

М – маркер молекулярной массы.

К – контрольная ДНК (ДНК, разведенная до концентрации 6,25 пг/мкл, что примерно соответствует концентрации ДНК в одной клетке).

1 - 7 – номера образцов генетического материала бластомеров после ПГА.

Длина амплифицированных фрагментов ДНК лежала в диапазоне длин от 300 до 600 п.н. Как уже отмечалось выше, из 35 образцов в 3-х визуально наблюдали тусклые полосы (бенды), характеризующие недостаточную амплификацию геномной ДНК.

### *HLA-генотипирование*

HLA-генотипирование проводили с использованием коммерческих наборов на основе технологии SSO, принцип которой основан на амплификации геномной ДНК из образца с последующей гибридизацией на олигонуклеотидных зондах нанесенных на микросферы. Для исследования использовали генетический материал после ПГА, полученный от всех 35 эмбрионов, а также соответствующую геномную ДНК от всех родительских пар. Правильная комбинация всех родительских аллелей HLA генов II класса во всех исследованных локусах (DRB1, DQA и DQB) была определена в 31 (88,6%) образце (табл. 1). В образцах

амплифицированной ДНК с тусклой (3 эмбриона) или нормальной (1 эмбрион) визуализацией бендов на геле были определены не корректно одна из аллелей (3 случая) или обе аллели (1 случай).

Таблица 1 – Результаты HLA-генотипирования эмбрионов по локусам DRB1, DQA и DQB с указанием числа совпадений с родительскими аллелями.

Число совпадений	Локусы HLA			Совпадения по всем трем локусам HLA
	DRB1	DQA	DQB	
по материнской аллели	35 (100%)	34 (97,1%)	34 (97,1%)	34 (97,1%)
по отцовской аллели	33 (94,3%)	32 (91,4%)	33 (94,3%)	31 (88,6%)
по обеим аллелям	33 (94,3%)	32 (91,4%)	32 (91,4%)	31 (88,6%)

Как видно из представленных данных в подавляющем большинстве случаев (88,6%) подтвердилась возможность проведения HLA-генотипирования после выполнения ПГА генетического материала blastomeres, полученных на 3-й день дробления эмбрионов. Для выполнения процедуры ЭКО, по возможности, отбирали эмбрионы, HLA гаплотип которых характеризовался максимальной гетерозиготностью по исследованным локусам HLA генов II класса.

#### *Масс-спектрометрическая детекция полиморфизмов (SNP)*

MALDI-TOF масс-спектрометрия позволяет быстро, с высокой точностью и производительностью определять наличие генетических полиморфизмов, не требуя использования дорогостоящих изотопных или флуоресцентных меток. Результат измерения представляет собой масс-спектр продуктов реакции минисеквенирования в виде пиков, соответствующих ионам определенной молекулярной массы, по которым выносят суждение о нуклеотидных заменах в данном положении [10].

Процесс идентификации SNP данным методом включает следующие основные этапы. На матрице геномной ДНК, выделенной из венозной крови пациента, проводят амплификацию фрагментов генов, включающих исследуемый SNP полиморфизм. Далее выполняют дефосфорилирование

продуктов амплификации ДНК с целью гидролиза дНТФ, которые препятствуют реакции минисеквенирования. Для этого используется щелочная фосфатаза креветки (rSAP - от англ. recombinant Shrimp Alkaline Phosphatase), которая дефосфорилирует 5'- и 3'-монофосфатные концы олигонуклеотидов и нуклеотидов, но не проявляет активности в отношении молекул ДНК и РНК, имеющих на концах 2 - 3 фосфатных остатка. Для проведения минисеквенирования используют короткий олигонуклеотидный зонд (от 15 до 30 нуклеотидов), который отжигается на ДНК матрице непосредственно перед нуклеотидом, где может иметь место замена (полиморфизм), а также строго определенный набор из 2'-дезоксинуклеотидов (dNTP) и 2',3'-дидезокситринуклеотидов (ddNTP) – терминаторы (не способны создавать фосфодиэфирную связь со следующим нуклеотидом). В ходе минисеквенирования ДНК-полимераза достраивает зонд комплементарно матрице, в роли которой выступает амплифицированный фрагмент нужного гена, с образованием продуктов разной молекулярной массы. Принципиальная схема реакции минисеквенирования представлена на рис. 3.

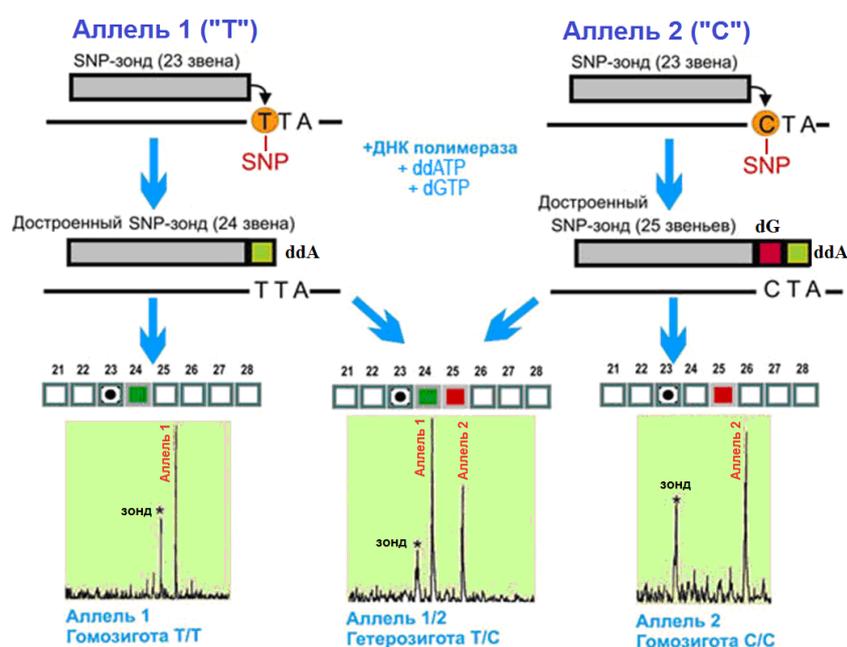


Рис. 3 – Принципиальная схема реакции минисеквенирования и масс-спектрометрического анализа продуктов реакции

Например, на матрице ACCGATGGCCGATGCATC[C/T]GTC (замена C>T) при использовании зонда с 5'-ACCGATGGCCGATGCATC-3' с набором нуклеотидов dT, ddC и ddG, продуктами реакции минисеквенирования будут: продукт – ACCGATGGCCGATGCATC+ddC, в случае аллеля "С" (5758 Да); продукт – ACCGATGGCCGATGCATC+dT+ddG, в случае аллеля "Т" (6102 Да); оба продукта – при гетерозиготном генотипе (рис. 4).

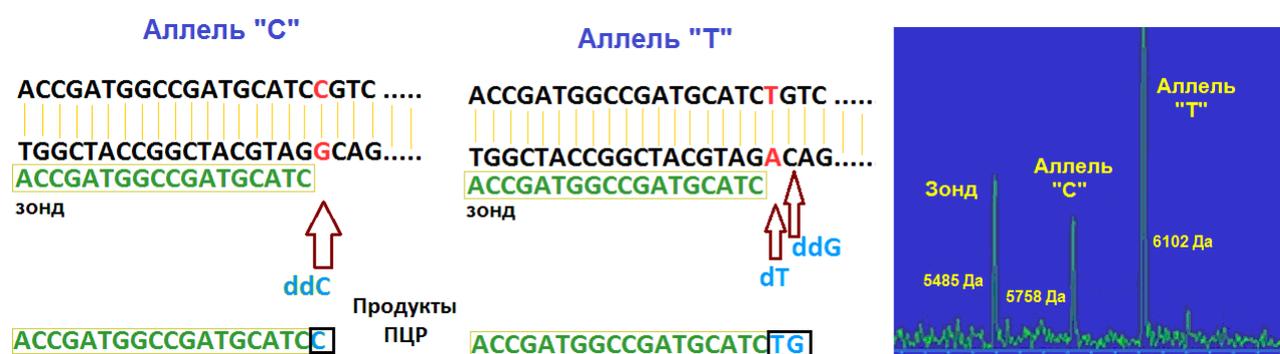


Рис. 4 – Пример реакции минисеквенирования с использованием зонда (5485 Да) и набора нуклеотидов dT, ddC, ddG с последующей детекцией ПЦР-продуктов (5758 Да и 6102 Да), соответствующих аллелям "С" и "Т"

В настоящем исследовании использовали времяпролетный масс-спектрометр MALDI-TOF "Autoflex speed T" (Bruker, Германия) и набор реагентов "SNP-экспресс-MS" (Литех, Россия) к SNP следующих генов: фактор Ляйдена (F5), MTHFR, MTR и MTRR. Все этапы реакции минисеквенирования выполняли согласно протоколу производителя. Продукты минисеквенирования в объеме 0,4 мкл, наносили на мишень ("AnchorChip"), предварительно покрытую матрицей на основе 3-гидроксипиколиновой кислоты. После высушивания мишени с нанесенными образцами ее помещали в масс-спектрометр. Регистрацию и анализ масс-спектров выполняли при помощи стандартного пакета программ для масс-спектрометра "Autoflex Speed": "Flex Control", "FlexAnalysis" и "Genotools".

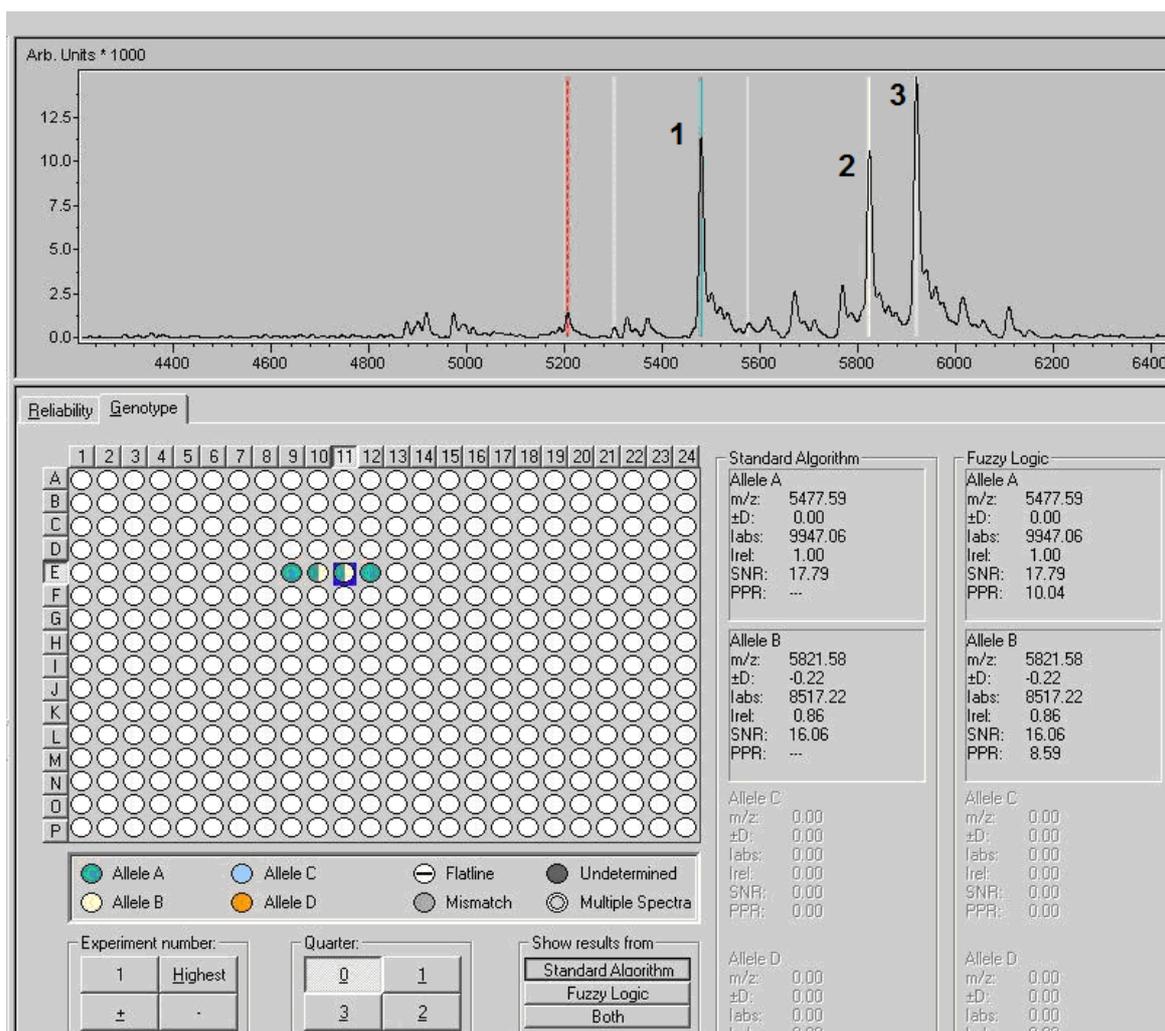


Рис. 5. – Пример мультиплексного определения в программе "Genotoools" двух SNP гена аполипопротеина Е (АpoЕ): R158C (\*2) C>T (гетерозигота, пик "1") и C112R (\*4) T>C (гомозигота, пики "2" и "3")

Для каждого из аллелей конкретного SNP в программе "Genotoools" создавали соответствующий протокол, включающий нуклеотидную последовательность зонда, типы нуклеотидов и терминаторов. После записи всех протоколов программа позволяла автоматически рассчитывать параметры масс-спектров для всего набора SNP с определением соответствующих им аллелей. Пример, результата мультиплексного анализа в программе "Genotoools", когда в одной пробе определяли несколько (два) SNP, показан на рис. 5.

В настоящем исследовании у эмбрионов потенциально пригодных для переноса исследовали SNP-профиль наиболее важных полиморфизмов, связанных с системой свертываемости крови. Это представляется особенно важным, например, для пациенток с наследственной формой тромбофилии, поскольку наличие данных мутаций у их эмбрионов может сказываться в дальнейшем на репродуктивной функции и высоком риске тромботических осложнений у потомков [4]. Для диагностики полиморфизмов использовали генетический материал после ПГА, полученный от всех 35 эмбрионов, а также соответствующую геномную ДНК всех родительских пар. Правильная комбинация всех родительских аллелей полиморфизмов в исследованных генах была определена в 32 (91,4%) образцах. В 3-х образцах амплифицированной ДНК демонстрирующих тусклую визуализацию бендов на агарозном геле полиморфизмы в генах MTHFR и MTR были определены не корректно по одной из родительских аллелей.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности успешной реализации расширенного ПГС, который помимо диагностики хромосомных аномалий методом aCGH позволяет одновременно осуществить стратегию отбора эмбрионов на предрасположенность к различным заболеваниям (например, неблагоприятных SNP для генов системы свертывания крови), а также выбор эмбриона с оптимальным HLA гаплотипом в случаях выраженной совместимости родителей по HLA-генам.

**Список литературы**

1. Серов В.Н., Горин В.С., Жабин С.Г., Горин Р.В., Маркдорф А.Г., Шин А.П. Новые методические подходы в пренатальной диагностике хромосомных заболеваний (обзор литературы) // Проблемы репродукции. - 2000. - № 2. - С. 11-18.
2. Буяновская О.А., Глинкина Ж.И., Каретникова Н.А., Бахарев В.А. Молекулярно-генетические методы в пренатальной диагностике хромосомных аномалий // Акушерство и гинекология. – 2012. – № 8., Т.1 – С. 3–9.
3. Екимова Е.В., Екимов А.Н., Алексеева М.Л. Роль молекулярных методов диагностики в преимплантационном скрининге эмбрионов (обзор литературы) // Проблемы репродукции. - 2012. - №6. - С. 56-59.
4. Макацария А.Д., Бицадзе В.О., Смирнова Л.М., Акиншина СВ., Баймурадова СМ. Тромбогеморрагические осложнения в акушерско-гинекологической практике: Рук. для врачей. - М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2011. – 1056 с.
5. Nicolaidis K.H., Syngelaki A., Gil M., Atanasova V. and Markova D. Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y // Prenatal Diagnosis. - 2013. - V.33, 6. - P. 575-579.
6. Хорошкеева О.В., Тетруашвили Н.К., Агаджанова А.А., Бурменская О.В., Трофимов Д.Ю. Полная гистосовместимость матери и плода как один из факторов преждевременных родов и плацентарной недостаточности // Акушерство и гинекология. – 2015. – № 10. – С. 103–106.
7. Лебедев И.Я., Черемных А.Д., Назаренко С.А., Светлаков А.В. Полногеномная амплификация ДНК: современные достижения и перспективы использования в преимплантационной генетической диагностике // Проблемы репродукции, 2005. - № 5. - С. 60-67.
8. Huang L., Ma F., Chapman A., Lu S., Xie X.S. Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications // Annu Rev Genomics Hum Genet. 2015;16:79-102.
9. Huang Lei, Ma Fei, Chapman Alec, Lu Sijia, and Xie Sunney Xiaoliang Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications // Annu. Rev. Genom. Human Genet. 2015.16:79-102.
10. Степанов В.А., Трифонова Е.А. Мультиплексное генотипирование однонуклеотидных полиморфных маркеров методом масс-спектрометрии MALDI-TOF: частоты 56 SNP в генах иммунного ответа в популяциях человека // Молекулярная биология. – 2013. – Т.47, № 6. – С. 1–11.

**References**

1. Serov V.N., Gorin V.S., Zhabin S.G., Gorin R.V., Markdorf A.G., Shin A.P. Noye metodicheskie podhody v prenatal'noj diagnostike hromosomnyh zabolevanij (obzor literatury) // Problemy reprodukcii. - 2000. - № 2. - S. 11-18.
2. Bujanovskaja O.A., Glinkina Zh.I., Karetnikova N.A., Baharev V.A. Molekuljarno-geneticheskie metody v prenatal'noj diagnostike hromosomnyh anomalij // Akusherstvo i ginekologija. – 2012. – № 8., Т.1 – S. 3–9.
3. Ekimova E.V., Ekimov A.N., Alekseeva M.L. Rol' molekuljarnyh metodov diagnostiki v preimplantacionnom skrininge jembrionov (obzor literatury) // Problemy reprodukcii. - 2012. - №6. - S. 56-59.
4. Makacarija A.D., Bicadze V.O., Smirnova L.M., Akin'shina SV., Bajmuradova SM. Trombogemorragicheskie oslozhnenija v akushersko-ginekologicheskoy praktike: Ruk. dlja vrachej. - M.: ООО "Medicinskoe informacionnoe agentstvo", 2011. – 1056 s.

5. Nicolaidis K.H., Syngelaki A., Gil M., Atanasova V. and Markova D. Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y // *Prenatal Diagnosis*. - 2013. - V.33, 6. - R. 575-579.

6. Horoshkeeva O.B., Tetrushvili H.K., Agadzhanova A.A., Burmenskaja O.V., Trofimov D.Ju. Polnaja gistosovmestimost' materi i ploda kak odin iz faktorov prezhdevremennyh rodov i placentarnoj nedostatochnosti // *Akusherstvo i ginekologija*. – 2015. – № 10. – S. 103–106.

7. Lebedev I.Ja., Cheremnyh A.D., Nazarenko S.A., Svetlakov A.V. Polnogenomnaja amplifikacija DNK: sovremennye dostizhenija i perspektivy ispol'zovanija v preimplantacionnoj geneticheskoj diagnostike // *Problemy reprodukcii*, 2005. - № 5. - S. 60-67.

8. Huang L., Ma F., Chapman A., Lu S., Xie X.S. Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications // *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2015;16:79-102.

9. Huang Lei, Ma Fei, Chapman Alec, Lu Sijia, and Xie Sunney Xiaoliang Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications // *Annu. Rev. Genom. Human Genet*. 2015.16:79-102.

10. Stepanov V.A., Trifonova E.A. Multipleksnoe genotipirovanie odnonukleotidnyh polimorfnyh markerov metodom mass-spektrometrii MALDI-TOF: chastoty 56 SNP v genah immunnogo otveta v populacijah cheloveka // *Molekuljarnaja biologija*. – 2013. – T.47, № 6. – S. 1–11.