

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

НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА АНЕУПЛОИДИЙ У ПЛОДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРОФОБЛАСТОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ МАТЕРИ

NON-INVASIVE DIAGNOSTICS OF ANEUPLOIDY OF A FETUS WITH CIRCULATING TROPHOBLAST CELLS IN MATERNAL BLOOD

Гудков Георгий Владимирович
д.м.н., профессор

Gudkov Georgy Vladimirovich
Dr.Sci.Med., professor

Филиппов Евгений Федорович
д.м.н., профессор
ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, кафедра клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, г. Краснодар, Россия

Filippov Evgeny Fedorovich
Dr.Sci.Med., professor
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.

Пивень Александр Владимирович
биолог

Piven Aleksandr Vladimirovich
Biologist

Тарасов Ярослав Владимирович
Биолог
Отделение клеточных и репродуктивных технологий МБУЗ «Детская городская клиническая больница №1», г. Краснодар, Россия

Tarasov Yaroslav Vladimirovich
Biologist
Department of cellular reproductive technologies of "Children's city clinical hospital №1", Krasnodar, Russia

Выделение клеток фетального происхождения из крови беременной представляет большую актуальность для получения информации о геноме плода и реализации в широкой клинической практике скрининговых методов неинвазивной пренатальной диагностики. В работе предложены эффективные способы сортировки трофобластов, циркулирующих в крови матери, для их использования в диагностике анеуплоидий у плода в ранних сроках гестации на основе анализа микросателлитных маркеров хромосом наиболее подверженных числовым aberrациям (13, 18, 21, X и Y). Набор микросателлитных маркеров позволил выявить анеуплоидии у трех беременных, а также исключить мозаицизм и загрязнение образца материнскими клетками. Ретроспективный анализ по данным инвазивного цитогенетического исследования (хорионбиопсия) подтвердил полученные результаты исследования

Isolation of fetal cells from the blood of a pregnant woman is more relevant for receiving the information of the genome of a fetus and implementation in clinical practice, non-invasive screening methods for prenatal diagnosis. The work proposes efficient ways of sorting trophoblasts circulating in maternal blood for the diagnosis of fetal aneuploidy in early gestation by analyzing microsatellite marker of the chromosomes that most prone to numerical aberrations (13, 18, 21, X and Y). A set of microsatellite markers allowed to reveal aneuploidy in three pregnant women, and also to exclude mosaicism and contamination of samples with maternal cells. A retrospective analysis of data on invasive cytogenetic studies (chorionic villus sampling) confirmed the results of the study

Ключевые слова: НЕИНВАЗИВНАЯ ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА, ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ, ТРОФОБЛАСТЫ, ТРИСОМИЯ, КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ, ПОЛНОГЕНОМНАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ, МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ МАРКЕРЫ

Keywords: NON-INVASIVE PRENATAL DIAGNOSIS, FLOW CYTOMETRY, TROPHOBLASTS, TRISOMY, FLUORESCENCE QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION, WHOLE GENOME AMPLIFICATION, MICROSATELLITE MARKERS

Doi: 10.21515/1990-4665-123-131

Современные скрининговые методы – ультразвуковое исследование, биохимические тесты, как правило, не дают точного диагноза, а позволяют только заподозрить возможную хромосомную аномалию плода [1]. Для ее подтверждения используется инвазивная пренатальная диагностика (амниоцентеза, биопсии ворсин хориона), которая с высокой точностью позволяет установить основные хромосомные нарушения: синдром Дауна (трисомия по хромосоме 21), Эдвардса (трисомия по хромосоме 18), Патау (трисомия по хромосоме 13), Шерешевского-Тернера (моносомия по X-хромосоме), а также наследственные болезни [2, 3]. К сожалению, инвазивные методы имеют ряд недостатков, таких, как угроза прерывания беременности, инфицирование плода, развитие кровотечения и т. д [18]. Поэтому в настоящее время все чаще используют различные методы неинвазивной пренатальной диагностики (НИПД), при которой исследуемым материалом является кровь матери, что делает этот подход абсолютно безопасным [4, 5].

С 2012 года в акушерских клиниках мира начал внедряться метод неинвазивной пренатальной диагностики, в основе которого лежит метод таргетного массового параллельного секвенирования (Т-MPS, англ. Target Massive Parallel Sequencing) внеклеточных фрагментов фетальной ДНК циркулирующих в крови матери [5, 6]. В настоящее время он считается наиболее достоверным способом выявления генетической патологии у плода. Однако высокая стоимость этого сложного исследования является главным препятствием для его широкого внедрения в акушерскую практику [2,8].

Более доступный подход может быть реализован на основе технологии захвата клеток плода, циркулирующих в крови матери [8]. По целому ряду причин наиболее перспективными клетками-кандидатами для

этой цели могут служить клетки трофобласта [9]. Генетический материал этих ядродержащих клеток является потенциальным источником фетальной ДНК для последующего пренатального генетического скрининга начиная с 9-й недели гестации. Экстремально низкое содержание трофобластов в крови матери (несколько клеток в 1 мл материнской крови) и, соответственно, трудности, связанные с выбором оптимальных технологий для их обогащения, детекции и захвата, сдерживают развитие данного направления и требуют дальнейших исследований [10, 11].

На пути решения этих задач актуален поиск оптимальных методов флуоресцентно-активированной клеточной сортировки, способов обогащения трофобластов из образца материнской крови, выбор специфических моноклональных антител к их антигенам, а также совершенствование протоколов молекулярной диагностики амплифицированного генетического материала, полученного из единичной клетки [12, 13, 14]. Библиотека амплифицированных фрагментов должна репрезентативно отражать геном единичной клетки и давать воспроизводимые результаты в ходе фрагментного анализа коротких tandemных повторов микросателлитной ДНК в хромосомах наиболее подверженных числовым aberrациям (например, 21-, 18-, 13-я и половые хромосомы) [15, 16, 17].

Цель настоящего исследования заключалась в оптимизации технологий выделения трофобластов, циркулирующих в крови матери, для неинвазивной пренатальной диагностики на основе анализа коротких tandemных повторов микросателлитной ДНК хромосом, наиболее подверженных числовым aberrациям.

Материалы и методы

Нами были проанализированы образцы периферической крови, полученные от 15 женщин с одноплодной беременностью в сроках гестации 8-13 недель из группы высокого риска по рождению детей с врожденной патологией. Средний возраст обследованных женщин составил 28 лет (от 23 до 37 лет). У 8 (53,3%) настоящая беременность была первой, у остальных – повторной. По совокупности данных анамнеза, показаний ультразвукового и биохимического скрининга все женщины были направлены на медико-генетическое консультирование для планирования и проведения инвазивной пренатальной диагностики. Кордоцентез был выполнен всем беременным в сроках гестации 15-20 недель. Кариотип каждого образца пуповинной крови был установлен в ходе стандартного цитогенетического исследования (культура лимфоцитов пуповинной крови) и служил подтверждением результатов ранее выполненной (до 12 недель) неинвазивной пренатальной диагностики.

Периферическую гепаринизированную венозную кровь беременных в объеме 10 мл обрабатывали не позднее 6 часов после забора. Разбавленную в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) 1:1 цельную кровь наслаивали на градиент Histopaque-1077 (плотность 1.077 г/мл) в 50 мл пробирку (15 мл градиента на 20 мл разведенной крови). После центрифугирования при $800\times g$ в течение 30 минут при комнатной температуре мононуклеарные клетки переносили в отдельную 15 мл пробирку и дважды отмывали в буфере (0,5% БСА в ФСБ с 2 мМ ЭДТА). Полученный образец мононуклеарных клеток ($\sim 2\times 10^7$ клеток в 800 мкл) подвергали негативной иммуномагнитной сепарации с применением набора BD Human Lineage Cell Depletion Set (BD Biosciences, США), согласно инструкции производителя. Исходный образец мононуклеарных клеток истощали по маркерам зрелых линейно дифференцированных клеток: CD3 (Т-клетки), CD19 (В-клетки), CD16 и CD56 (NK-клетки),

CD41a (тромбоциты), CD235a (эритроциты). Далее к истощенной по линейным антигенам популяции клеток добавляли Fc Block™ (BD Biosciences, США) для предотвращения неспецифического связывания с Fc-рецепторами. Трехцветное окрашивание проводили моноклональными антителами (BioLegend Inc., США) против HLA-G, меченными аллофикоцианином (APC), Trop-2, меченными фикоэритрином (PE) и CD45, меченными флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). Для надежной дискриминации ядродержащих клеток их окрашивали при помощи Hoechst 33342 ("BD Biosciences", США). Анализ клеточных популяций и сортировку трофобластов выполняли на проточном цитометре-сортере BD FACS AriaIII (BD Biosciences, США) снабженном четырьмя лазерами (405, 488, 561 и 633 нм) с использованием сопла диаметра 85 мкм. Полногеномную амплификацию (ПГА) ДНК отсортированных клеток проводили при помощи набора PicoPLEX™ WGA Kit (Rubicon Genomics, США) и амплификатора C-1000 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) с электрофоретическим контролем продуктов амплификации на Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies, США). Амплифицированную ДНК далее использовали для проведения количественной флуоресцентной полимеразой реакции (КФ ПЦР) при помощи реагентов Aneufast Multiplex QF-PCR Kit (Genomed, United Kingdom), содержащих маркеры к коротким tandemным повторам (Short Tandem Repeat, STR) микросателлитной ДНК хромосом, наиболее подверженных числовым aberrациям (13, 18, 21, X и Y). Фрагментный анализ продуктов КФ ПЦР выполняли на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xL (Applied Biosystems, США) с использованием размерного стандарта GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard v2.0 и программного обеспечения GeneMapper® Software v5.0. Экстракцию ДНК матери и отца выполняли сорбционным способом при помощи набора реагентов ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, США) из образца крови объемом 200 мкл.

Результаты

Центрифугирование в градиенте плотности с последующей магнитной сепарацией позволило истощить исходный образец периферической крови от линейно дифференцированных клеток и получить взвесь клеток, максимально обогащенную клетками-кандидатами (трофобластами). Среднее число выделенных клеток после негативной сепарации по маркерам зрелых линейно дифференцированных клеток составило $1,54 \pm 0,08 \times 10^5$ (среднее \pm SE) в 300 мкл буфера, что соответствовало средней концентрации $\sim 4,72 \times 10^5$ клеток/мл. По результатам контрольной цитометрии с использованием коктейля моноклональных антител против линейных маркеров зрелых клеток степень истощения превышала 90% ($93,1 \pm 2,14\%$).

Негативную фракцию клеток подвергали специфическому иммуноокрашиванию для выявления популяции трофобластов. По скатерограммам прямого и бокового светорассеяния из анализа исключали фрагменты разрушенных клеток (дебрис), проводили дискриминацию дублетов и агрегатов клеток. Внутри гейта живых яросодержащих клеток негативных по панлейкоцитарному маркеру (CD45) выделяли двойной позитивный гейт HLA-G⁺Trop-2⁺, который использовали для дальнейшей сортировки (**рис. 1**).

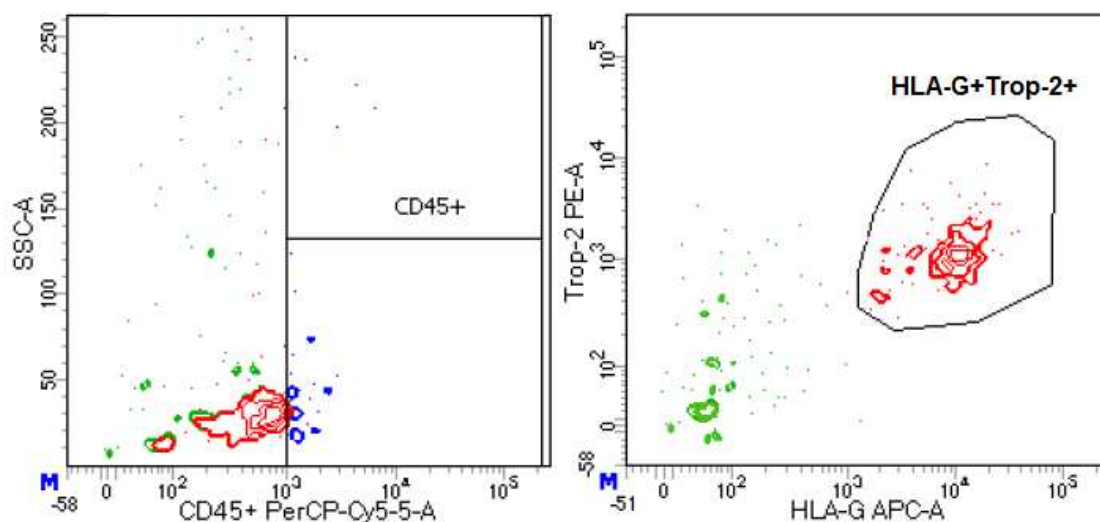


Рис. 1. Выделение гейта сортировки трофобластов (Trop-2⁺HLA-G⁺) среди популяции клеток негативных по CD45

Сортировку проводили согласно рекомендациям производителя с заданными параметрами (диаметр сопла – 85 мкм, маска чистоты – "Single Cell Precision", в камере сбора клеток – устройство для сортировки в пробирки объемом 5 мл) до полного расходования пробы. Индивидуальные колебания общего числа событий в ходе сортировки составляли от 63 до 286 тыс. (среднее – 158,3±77,4 тыс.). Число клеток-кандидатов, удовлетворяющих критериям сортировки CD45⁻HLA-G⁺Trop-2⁺, составило 34,4±10,3 клеток. Далее отсортированные в пробирки единичные клетки-кандидаты подвергали полногеномной амплификации согласно инструкции производителя. Электрофоретический контроль показал во всех образцах высокую концентрацию мультикопий нативной ДНК из единичных клеток (рис. 2), которая после очистки составила 56,8±10,1 нг/мкл.

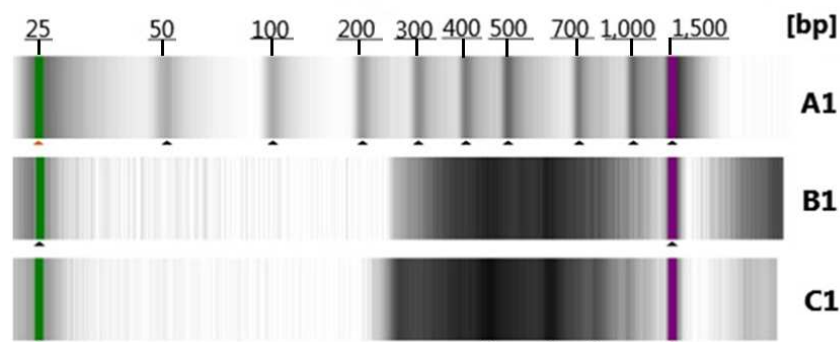


Рис. 2. Электрофоретический контроль продуктов полногеномной амплификации (A1 – маркер числа пар нуклеотидов, B1 и C1 – примеры образцов); Agilent 2200 TapeStation

ПГА была важным этапом, благодаря которому получали библиотеку амплифицированных фрагментов, репрезентативно представляющую геномную ДНК из единичных клеток для последующего выполнения мультиплексной КФ ПЦР. Используемые флуоресцентно меченые праймеры специфичны к индивидуальным STR последовательностям (маркерам), благодаря которым формируются ампликоны фрагментов разной длины – аллели. Капиллярный электрофорез позволяет разделить полученную в ходе КФ ПЦР совокупность меченых фрагментов (аллелей) и провести сравнение числа пиков и их высоты (площади) для каждого STR маркера (рис. 3).

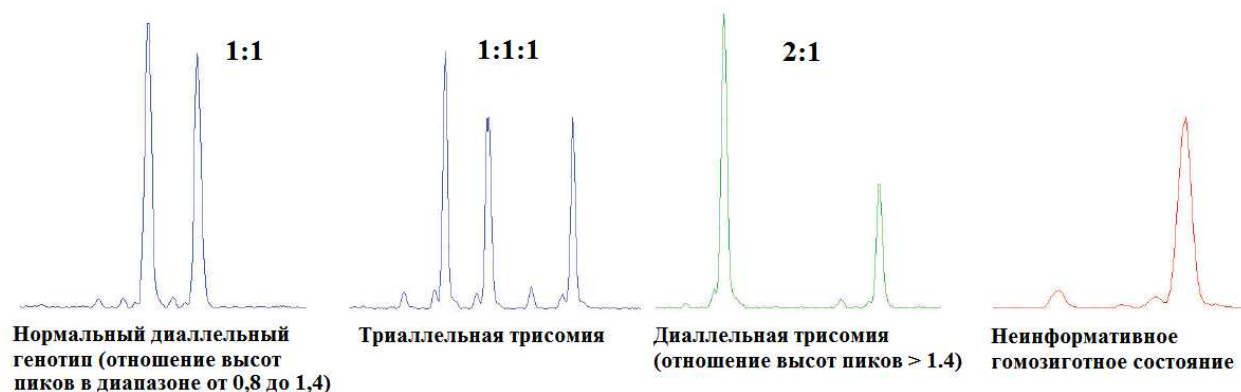


Рис. 3. Профиль пиков для фрагментов STR маркеров, полученных в ходе капиллярного электрофореза продуктов КФ ПЦР

В случае нормальной дисомии конкретный STR маркер имеет либо два аллеля разной длины с одинаковой высотой пиков 1:1 (нормальная, сбалансированная, гетерозигота), либо два аллеля одной длины (гомозигота) с единственным пиком (неинформативный вариант). Трисомия может быть представлена либо тремя сбалансированными пиками для разных аллелей примерно одной высоты 1:1:1 (триаллельная трисомия), либо диаллельным (несбалансированным) вариантом (2:1 или 1:2). При гомозиготности аллелей или моносомии STR маркер представлен только единственным пиком, что не позволяет различить эти два состояния, особенно при анализе половых хромосом. Например, гомозиготное состояние по X хромосоме можно не отличить от моносомии по данной хромосоме. Чтобы исключить подобные ошибки для каждой хромосомы брали 2-3 маркера, что уменьшало вероятность их одновременной гомозиготности (неинформативности).

Возможны различные искажения профиля STR маркеров по причине: мозаицизма, контаминации материнской ДНК, появления "stutter" артефактов, преимущественной амплификации одного из аллелей, наличия полиморфизмов на сайтах отжига праймеров, появления соматических мутаций в пределах микросателлитных областей и др.

С учетом того, что наибольшая плотность длин фрагментов ДНК, полученных в ходе ПГА, приходилась на диапазон 400-700 пар нуклеотидов (рис. 2), было отобрано по три наиболее коротких STR маркера (длиной менее 300 пар нуклеотидов) для 21-й и 18-й хромосом и два STR маркера для 13-й хромосомы (**табл. 1**).

Таблица 1

STR маркеры используемые для характеристики полиморфизмов в 21-, 18- и 13-й аутосомах (указаны максимальные диапазоны длин аллелей)

Хромосома 21	Хромосома 18	Хромосома 13
D21S1442 (136-174 п.н.)	D18S535 (126-156 п.н.)	D13S631 (192-218 п.н.)
D21S1435 (142-188 п.н.)	D18S391 (144-168 п.н.)	D13S258 (230-281 п.н.)
D21S1446 (200-228 п.н.)	D18S976 (164-184 п.н.)	

Помимо маркеров к аутосомам, использовали три маркера к псевдоаутосомным последовательностям половых хромосом – X22 (189-253 п.н.), DXYS267 (330-354 п.н.) и DXYS218 (266-294 п.н.), X-сцепленного маркера HPRT (264-313 п.н.), а также два маркера к непалиморфным последовательностям – *SRY*-гену (463 п.н.) и амелогенину (AMXY: для X хромосомы – 104 п.н.; для Y хромосомы – 109 п.н.).

Одновременно выполняли фрагментный анализ родительской ДНК по тем же микросателлитным маркерам. С учетом того, что аллели плода являются комбинацией аллелей родителей это позволяло верифицировать фетальное происхождение выделенных клеток (трофобластов) и исключать образцы сильно контаминированные материнской ДНК (рис. 4). Родительские аллели STR маркеров обозначали: материнские – *a* и *b*; отцовские – *c* и *d*. Согласно полученным результатам генетический материал из клеток трофобласта демонстрировал следующие комбинации родительских аллелей: *a/c* (32%), *b/c* (51%) и *b/d* (17%).

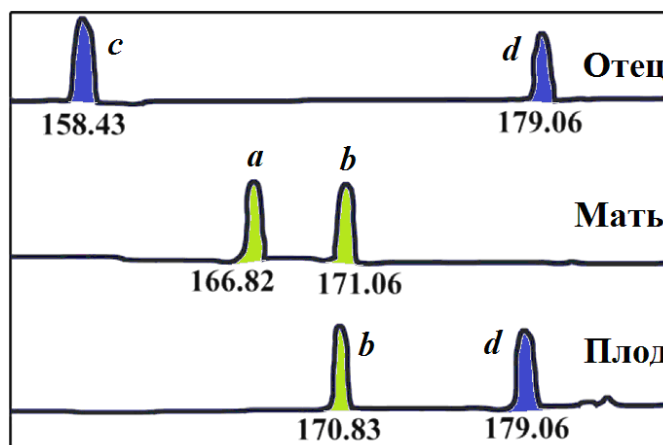


Рис. 4. Пример комбинации аллелей одного из STR маркеров у родителей и плода

В случаях незначительной контаминации образца материнской ДНК наблюдали дополнительные материнские аллели (аллели отсутствующие у плода), которые нельзя было отнести ни к трисомии, ни к мозаицизму, поскольку данные экстра-пики появлялись для STR маркеров всех хромосом. С увеличением степени контаминации образца материнскими клетками доминировали пики соответствующие материнским аллелям, а в случае вынашивания плода мужского пола также отмечался сильный дисбаланс высоты пиков для аллелей амелогенина (AMXY). Из 15 исследованных образцов только в 2 (13,3%) случаях имела место контаминация материнской ДНК в сочетании с небольшим количеством выделенных трофобластов (наблюдения №1 и №4, табл. 2), что приводило к выраженному снижению высоты пиков аллелей плода и невозможности корректного анализа.

В табл. 2 представлена обобщенная информация об информативности генотипов всех наборов STR маркеров для каждой из исследованных хромосом. Генотип STR маркера считался информативным, если пики, соответствующие аллелям плода могли быть отчетливо визуализированы на фоне слабо выраженных экстра-пиков материнских аллелей, а аллели STR маркеров, входящие в набор для

конкретной хромосомы, одновременно не находились в гомозиготном (неинформативном) состоянии.

Таблица 2

Информативность определения STR маркеров и их генотипы у обследованных беременных с различным числом выделенных трофобластов

№	Срок гестации	Число трофобластов	Информативность STR маркеров									Число "+"	Хромосомы				
			21-ая хромосома			18-ая хромосома			13-ая хромосома				21-я	18-я	13-я	X и Y	
			D21S1442	D21S1435	D21S1446	D18S535	D18S391	D18S976	D13S631	D13S258							
1.	9	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	XY
2.	11	25	+	+	+	+	+	-	+	+	7	2n	2n	2n	XY		
3.	10	26	+	-	-	+	+	+	+	-	5	2n	2n	2n	XX		
4.	8	18	+	-	-	+	-	-	-	-	2	2n	-	-	XY		
5.	10	45	+	+	+	+	+	+	+	+	8	3n	2n	2n	XY		
6.	12	38	+	+	-	+	+	+	+	+	7	2n	2n	2n	XY		
7.	9	36	+	+	-	+	+	+	+	-	6	2n	2n	2n	XX		
8.	9	53	+	+	+	+	+	+	+	+	8	2n	2n	2n	XY		
9.	11	27	+	+	-	+	+	+	+	-	6	2n	3n	2n	XY		
10.	8	34	+	+	+	+	+	+	+	-	7	2n	2n	2n	XY		
11.	13	44	+	+	+	+	+	-	+	+	7	2n	2n	2n	XX		
12.	10	41	+	+	-	+	+	+	+	+	7	2n	2n	2n	XY		
13.	9	38	+	+	-	+	+	+	+	+	7	2n	2n	2n	XY		
14.	8	39	+	+	+	+	+	+	+	-	7	3n	2n	2n	XX		
15.	11	24	+	+	-	+	-	+	+	+	6	2n	2n	2n	XX		
Число "+"			13	12	6	13	12	11	13	8							

Согласно полученным данным во всех наблюдениях пол плода был установлен (10 мужского пола и 5 женского). Анеуплоидия (трисомия) у плода была выявлена у трех беременных: у двух – по 21-й хромосоме (наблюдения №5 и №14) и одной – по 18-й (наблюдение №9). При ретроспективном анализе полученные результаты полностью соответствовали (за исключением двух наблюдений №1 и №4) данным

инвазивного цитогенетического исследования (хорионбиопсия), как при установлении пола плода, так и анеуплоидий.

Позитивная корреляция между числом выделенных трофобластов и числом информативных пиков STR маркеров для всех исследованных хромосом составила $r = + 0,82$. Связь между длиной фрагмента STR маркера и числом их успешных идентификаций в ходе капиллярного электрофореза носила негативный характер и составила $r = - 0,71$. Таким образом, размер фрагментов получаемых в ходе полногеномной амплификации генетического материала единичных клеток затрудняет воспроизведение некоторых длинных аллелей STR маркеров. Однако, данная проблема может быть отчасти устранена при увеличении числа выделенных трофобластов.

На рис. 5 представлен пример результатов анализа STR маркеров для одного из случаев трисомии по 21-й хромосоме (наблюдение №5).

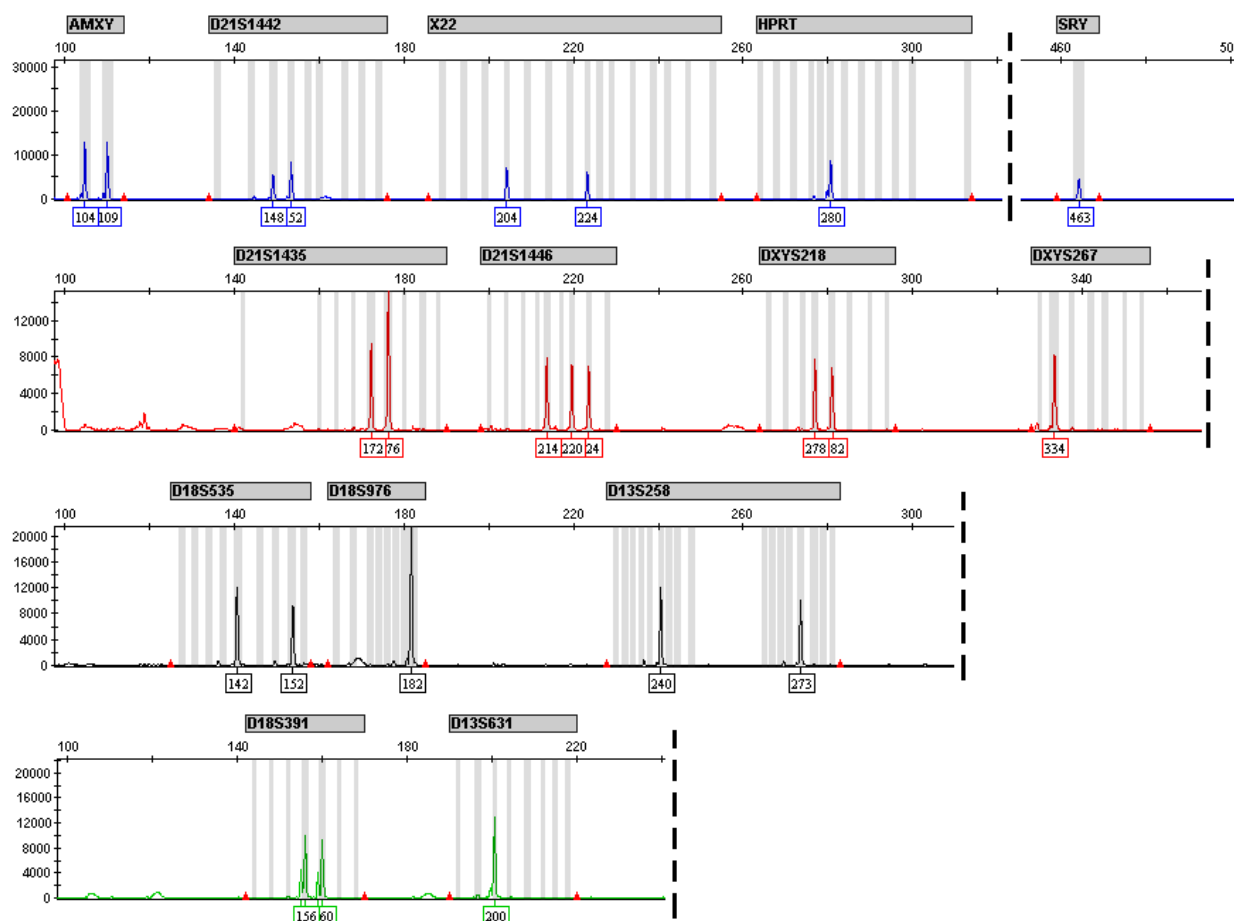


Рис. 5. Пример результатов анализа STR маркеров для одного из случаев трисомии по 21-й хромосоме (наблюдение №5)

На электрофореграмме среди непалиморфных маркеров можно видеть оба фрагмента (X и Y) соответствующих амелогенину (AMXY) и фрагмент соответствующий SRV-гену. Три псевдоаутосомных маркера имеют гетерозиготный паттерн (X22 и DXYS218), а один – гомозиготный (DXYS267). Вышеперечисленное указывает на нормальный мужской генотип (XY). В 13- и 18-й хромосомах только по одному из маркеров наблюдали гомозиготный, неинформативный, паттерн (D13S631 и D18S976, соответственно), остальные – имели нормальное гетерозиготное состояние. По 21-й хромосоме выявили анеуплоидию (трисомию): паттерн маркеров D21S1442 и D21S1435 отражал диаллельный вариант трисомии, а маркер D21S1446 – триаллельный вариант трисомии.

Обсуждение

Настоящее исследование показало возможность не только оптимизации технологии обогащения и сортировки клеток трофобласта, циркулирующих в крови матери, но и использование КФ ПЦР с последующим капиллярным электрофорезом флуоресцентного продукта для анализа STR маркеров хромосом наиболее подверженных числовым aberrациям. Привлекательная идея использования клеток трофобласта для НПД сталкивается с несколькими проблемами, связанными с их ультранизкой концентрацией в крови матери, контаминации образца материнскими клетками, возможностью получения геномной библиотеки, репрезентативно отражающей геном единичных клеток трофобласта.

Во многих работах показано, что циркулирующие в крови матери трофобласты могут служить источником генетического материала плода для НПД, несмотря на их плацентарное происхождение и проблему мозаицизма [11, 13]. Они появляются в крови матери уже на 6-й неделе гестации и не сохраняются после родов, относятся к эпителиальным клеткам, экспрессируют специфичные антигены, что облегчает их идентификацию и захват. Важным этапом является обогащение образца материнской крови целевыми клетками, в связи с чем, проводили иммуномагнитную негативную сепарацию по маркерам зрелых линейно дифференцированных клеток. Для проточной цитометрии и сортировки полученной негативной фракции использовали меченые моноклональные антитела к наиболее специфичным антигенам трофобластов [18]. Число клеток-кандидатов, удовлетворяющих критериям сортировки CD45⁻HLA-G⁺Trop-2⁺ составило 34,4±10,3 клеток. В связи с тем, что эффективность сортировки колебалась в пределах 90-97%, а меченные антитела к антигенам трофобластов могут неспецифически связываться с другими

клетками, популяция отсортированных клеток в разной степени контаминируется материнскими клетками.

Использование микросателлитного анализа позволило определить степень чистоты выделения популяции клеток плода (трофобластов) из крови матери. Согласно полученным данным технология обогащения и сортировки с использованием выбранной комбинации меченых антител имела высокую специфичность. Только в 2 (13,3%) наблюдениях отмечали значительную контаминацию материнской ДНК, при которой происходило выраженное снижение высоты пиков аллелей плода, что не позволило провести анализ.

ДНК единичных клеток трофобласта недостаточно для проведения микросателлитного анализа, поэтому предварительно необходимо получить геномную библиотеку фрагментов репрезентативно представляющей геном единичных клеток. Традиционные ПЦР методы не пригодны для данной задачи, поскольку неравномерно амплифицируют разные участки генома. Наиболее перспективной технологией полногеномной амплификации для решения этой задачи является метод на основе технологии MALBAC (Multiple Annealing and Looping-Based Amplification Cycles) [19]. Особенностью данного метода является наличие квазилинейного этапа предварительной амплификации, которая позволяет максимально полно реплицировать геномную ДНК и избежать неравномерности ее воспроизведения. Последнее может возникать в случаях, когда экспоненциальный этап амплификации начинается сразу после отжига праймеров, зачастую неравномерного, на матрице геномной ДНК. Полученные результаты показали эффективность этой методики, при помощи которой из ДНК единичных трофобластов получили геномную библиотеку с концентрацией ДНК $56,8 \pm 10,1$ нг/мкл (после очистки) и преимущественной длиной фрагментов от 300 до 700 пар нуклеотидов.

Полученную библиотеку амплифицированных фрагментов геномной ДНК из клеток трофобласта использовали для проведения мультиплексной КФ ПЦР, включающей 14 пар праймеров, один из которых имел соответствующую флуоресцентную метку (пятицветный набор – "G5 dye set"). Поскольку длина фрагментов в библиотеке была ограничена, то для анализа аутосом использовали два-три STR маркера, длина аллелей которых не превышала 300 п.н. Для идентификации половых хромосом использовали маркеры к псевдоаутосомным последовательностям и X-сцепленный маркер, а также два маркера к непалиморфным последовательностям – *SRY*-гену и амелогенину.

Анализ STR маркеров с использованием КФ ПЦР является общей стратегией клинических исследований для выявления хромосомных анеуплоидий, которые традиционно исследуют в ходе цитогенетического пренатального теста с анализом метафазных хромосом (кариотип). STR маркеры представляют собой многокопийные повторы от 2 до 6 пар оснований в полиморфных локусах микросателлитной ДНК. В каждом таком локусе число повторов может сильно различаться, что и обуславливает полиморфизм – наличие аллелей разной длины. Анализ анеуплоидий заключается в определении размера и числа таких аллелей для каждой из исследуемых хромосом.

Отдельной проблемой при исследовании STR маркеров является то, что для проведения КФ ПЦР используется не нативная геномная ДНК из небольшого количества трофобластов, а библиотека фрагментов, полученная в ходе ее полногеномной амплификации. Размер этих фрагментов (300-700 пар нуклеотидов) затрудняет воспроизведение некоторых длинных аллелей STR маркеров, что отчасти можно преодолеть за счет увеличения числа выделяемых трофобластов.

С учетом всех этих ограничений, использованный в настоящем исследовании набор микросателлитных маркеров позволил выявить

анеуплоидии у трех беременных, а также исключить мозаицизм и загрязнение образца материнским генетическим материалом (в 2-х наблюдениях). При ретроспективном анализе полученные результаты полностью совпали с данным инвазивного цитогенетического исследования (хорионбиопсия).

Таким образом, предлагаемые методы выделения трофобластов из крови беременной в ранних сроках гестации позволили реализовать метод скринингового анализа анеуплоидий для хромосом, наиболее подверженных числовым aberrациям. Дополнительным преимуществом предложенной технологии является то, что исследование может быть выполнено быстро, и не требует большого количества геномной ДНК из единичных клеток трофобласта.

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. Пантюх К.С., Шубина Е.С. Неинвазивная пренатальная диагностика анеуплоидий плода, основанная на секвенировании внеклеточной ДНК крови беременной женщины // Акуш. и гин. - 2015. - №8. - С. 5-11.
5. Сухих Г.Т., Каретникова Н.А., Баранова Е.С., Шубина Е.С., Коростин Д.О. и др. Неинвазивная пренатальная диагностика анеуплоидий методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) группе женщин высокого риска // Акуш. и гин. - 2015. - №4. - С. 5-11.
6. Allyse M, Minear MA, Berson E, Sridhar S, Rote M, Hung A, Chandrasekharan S. E Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges. *International journal of women's health*, 2015, 7:113-26.
7. Calabrese G, Baldi M, Fantasia D, Sessa MT, Kalantar M, Holzhauer C, Alunni-Fabbroni M, Palka G, Sitar G: Detection of chromosomal aneuploidies in fetal cells isolated from maternal blood using single-chromosome dual-probe FISH analysis // *Clin Genet*, 2012, 82:131–139.
8. Christensen B, Philip J, Kølvrå S, Lykke-Hansen L, Hom I. Fetal Cells in Maternal Blood: A Comparison of Methods for Cell Isolation and Identification. // *Fetal Diagnosis and Therapy*, 2005; 20:106-112.

9. Hatt L, Brinch M, Singh R, Møller K, Lauridsen RH, Uldbjerg N, Huppertz B, Christensen B, Kølvrå S. Characterization of fetal cells from the maternal circulation by microarray gene expression analysis-could the extravillous trophoblasts be a target for future cell-based non-invasive prenatal diagnosis? // *Fetal Diagn Ther.* 2014;35(3):218-27.

10. Manoussaka MS, Jackson DJ, Lock RJ, Sooranna SR, Kumpel BM. Flow cytometric characterisation of cells of differing densities isolated from human term placentae and enrichment of villous trophoblast cells // *Placenta.* – 2005. – Vol.26 (4). – P. 308-318.

11. Mouawia H, Saker A, Jais JP, et al. Circulating trophoblastic cells provide genetic diagnosis in 63 fetuses at risk for cystic fibrosis or spinal muscular atrophy. *Reprod Biomed Online* 2012;25:508–20.

12. 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.

13. Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Okazaki S, Farina A, Okai T. Clinical potential for noninvasive prenatal diagnosis through detection of fetal cells in maternal blood. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 2006, 45(1):10-20.

14. Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques // *Fetal Diagn Ther.* – 2010. – Vol. 27 (1). – P. 1-7.

15. Mouawia H. Genotyping analysis of circulating fetal cells reveals high frequency of vanishing twin following transfer of multiple embryos // *Avicenna J Med Biotechnol.* 2013 Apr;5(2):125-32.

16. Koumantaki Y., Sifakis S., Dragatis G., Matalliotakis I., Froudarakis G., Papadopoulou E., Koumantakis E. Microsatellite analysis provides efficient confirmation of fetal trophoblast isolation from maternal circulation // *Prenat Diagn.* 2001 Jul;21(7):566-70.

17. Emad A., Lamoureux, J., Ouellet A., Drouin R. Rapid aneuploidy detection of chromosomes 13, 18, 21, X and y using quantitative fluorescent polymerase chain reaction with few microdissected fetal cells // *Fetal Diagnosis and Therapy.* 2015 Aug; 38 (20): 65-76

18. Van Wijk IJ, Griffioen S, Tjoa ML, et al. HLA-G expression in trophoblast cells circulating in maternal peripheral blood during early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:991–7.

19. 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

References

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. Бужановская О.А., Глинка З.И., Каретникова Н.А., Бажарев 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. Пантjух К.С., Шубина Е.С. Неинвазивная пренатальная диагностика анеуплоидий плода, основанная на секвенировании внеклеточной ДНК крови беременной женщины // *Акуш. и гин.* - 2015. - №8. - С. 5-11.

5. Suhih G.T., Karetnikova N.A., Baranova E.S., Shubina E.S., Korostin D.O. i dr. Neinvazivnaja prenatal'naja diagnostika aneuploidij metodom vysokoproizvoditel'nogo sekvenirovanija (NGS) gruppe zhenshin vysokogo riska // *Akush. i gin.* - 2015. - №4. - S. 5-11.
6. Allyse M, Minear MA, Berson E, Sridhar S, Rote M, Hung A, Chandrasekharan S. E Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges. *International journal of women's health*, 2015, 7:113-26.
7. Calabrese G, Baldi M, Fantasia D, Sessa MT, Kalantar M, Holzhauser C, Alunni-Fabbroni M, Palka G, Sitar G: Detection of chromosomal aneuploidies in fetal cells isolated from maternal blood using single-chromosome dual-probe FISH analysis // *Clin Genet*, 2012, 82:131–139.
8. Christensen B, Philip J, Kølvrå S, Lykke-Hansen L, Hom I. Fetal Cells in Maternal Blood: A Comparison of Methods for Cell Isolation and Identification. // *Fetal Diagnosis and Therapy*, 2005; 20:106-112.
9. Hatt L, Brinch M, Singh R, Møller K, Lauridsen RH, Uldbjerg N, Huppertz B, Christensen B, Kølvrå S. Characterization of fetal cells from the maternal circulation by microarray gene expression analysis-could the extravillous trophoblasts be a target for future cell-based non-invasive prenatal diagnosis? // *Fetal Diagn Ther.* 2014;35(3):218-27.
10. Manoussaka MS, Jackson DJ, Lock RJ, Sooranna SR, Kumpel BM. Flow cytometric characterisation of cells of differing densities isolated from human term placentae and enrichment of villous trophoblast cells // *Placenta.* – 2005. – Vol.26 (4). – P. 308-318.
11. Mouawia H, Saker A, Jais JP, et al. Circulating trophoblastic cells provide genetic diagnosis in 63 fetuses at risk for cystic fibrosis or spinal muscular atrophy. *Reprod Biomed Online* 2012;25:508–20.
12. 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.
13. Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Okazaki S, Farina A, Okai T. Clinical potential for noninvasive prenatal diagnosis through detection of fetal cells in maternal blood. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 2006, 45(1):10-20.
14. Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques // *Fetal Diagn Ther.* – 2010. – Vol. 27 (1). – P. 1-7.
15. Mouawia H. Genotyping analysis of circulating fetal cells reveals high frequency of vanishing twin following transfer of multiple embryos // *Avicenna J Med Biotechnol.* 2013 Apr;5(2):125-32.
16. Koumantaki Y., Sifakis S., Dragatis G., Matalliotakis I., Froudarakis G., Papadopoulou E., Koumantakis E. Microsatellite analysis provides efficient confirmation of fetal trophoblast isolation from maternal circulation // *Prenat Diagn.* 2001 Jul;21(7):566-70.
17. Emad A., Lamoureux, J., Ouellet A., Drouin R. Rapid aneuploidy detection of chromosomes 13, 18, 21, X and y using quantitative fluorescent polymerase chain reaction with few microdissected fetal cells // *Fetal Diagnosis and Therapy.* 2015 Aug; 38 (20): 65-76
18. Van Wijk IJ, Griffioen S, Tjoa ML, et al. HLA-G expression in trophoblast cells circulating in maternal peripheral blood during early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:991–7.
19. 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