

5. Петеркова В.А., Семичев Т.В., Тюльпаков А.Н., Карева М.А. Аденогенитальный синдром у детей. Неонатальный скрининг, диагностика и лечение // Вопросы практической медицины – 2006. – Т.1. – №2. – С. 9-13.

6. Петрова Н.В., Зинченко Р.А., Гинтер Е.К. Расчет риска у новорожденных, выявленных при неонатальном скрининге на муковисцидоз // Медицинская генетика. – 2007. – Т. 6. – №11 (65). – С. 16-23.

7. Толстова В.Д., Каширская Н.Ю., Капранов Н.И. Массовый скрининг новорожденных на муковисцидоз в России // Фарматека. – 2008. – №1. – С. 38-43.

8. Fridovich-Keil J.L. Galactosemia: The Good, the Bad, and the Unknown // J. Cell Physiol. – 2006. – 209. – P. 701-705.

9. Kerem B.-S., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwald

M., Tsui L.-C. Identification of cystic fibrosis gene: genetic analysis // Science. – 1989. – 245. – P. 1073-1080.

10. Working Group on Neonatal Screening of the European Society for Paediatric Endocrinology: Procedure for neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // Horm. Res. – 2001. – 55. – P. 201-205.

Е.В. Маркова, О.М. Казанцева, В.Г. Артюхова, А.В. Светлаков ПРЕИМПЛАНТАЦИОННАЯ ДНК-ДИАГНОСТИКА МОНОГЕННОЙ ПАТОЛОГИИ

УДК 575.224.22, 616

Преимплантационная генетическая диагностика (ПГД) позволяет проводить профилактику генных болезней на самых ранних этапах эмбрионального развития человека. Несмотря на сложности такой диагностики, включающие необходимость проведения для супружеской пары экстракорпорального оплодотворения, ограниченное время выполнения исследования и минимальное количество ДНК, технология ПГД быстро развивается и становится частью клинической практики. Одной из главных проблем, которая решается в ДНК-исследованиях единичных клеток, является эффективная амплификация генетического материала.

Ключевые слова: преимплантационная генетическая диагностика, моногенные заболевания, ПЦР.

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) provides an opportunity to prevent single gene disorders at the earliest stages of human embryo development. Despite complications of this diagnosis, including the necessity of IVF (in vitro fertilization) for partners, limited time for analysis performing and minimum DNA quantity, PGD technique is developing very fast and becoming a part of clinical practice. One of the main problems to solve for DNA analysis of single cells is effective amplification of genetic material.

Keywords: preimplantation genetic diagnosis, single gene disorders, PCR.

Введение

Новое направление ранней диагностики наследственных заболеваний связано с развитием преимплантационной генетической диагностики (ПГД). Такая диагностика делает возможным проведение генетического обследования не только до рождения ребенка, но и до наступления беременности – на самых ранних этапах эмбрионального развития. При проведении ПГД исследование выполняется на минимальном количестве генетического материала – геноме единичной клетки.

Преимплантационное исследование возможно исключительно в рамках лечебных циклов ЭКО (экстракорпорального оплодотворения) либо ИКСИ (инъекции сперматозоида в яйцеклетку). Большая часть циклов ПГД проводится с целью выявления анеуплоидий, хромосомных перестроек. Это обусловлено тем, что показания к такому типу ПГД часто характерны для пациентов с репродуктивными нарушениями, прибегающими к ЭКО.

Показанием для ПГД моногенных дефектов служит высокий генетический риск в отношении генной болезни. Такие пары прибегают к ЭКО исклю-

чительно с целью проведения ДНК-диагностики эмбрионов и отбора для переноса в матку эмбрионов с нормальным генотипом [12]. Преимуществом ПГД является сохранение репродуктивного здоровья пары благодаря возможности избежать прерывания беременности большим плодом, снижение психо-эмоциональной нагрузки на женщину во время беременности (беспокойство о необходимости проведения инвазивной пренатальной диагностики и прерывания по результатам исследования). Особенно актуальна разработка новых методов профилактики наследственной патологии для популяций с высокой частотой отдельных заболеваний.

По данным ESHRE PGD Consortium, опубликованным в 2008 г., обобщающим результаты циклов ПГД по 2005 г., на тот период в мире было проведено 2099 циклов ПГД моногенных дефектов [5].

Подходы к ДНК-анализу в ПГД отличаются от стандартных методов генетического тестирования. Сопоставление сложности и рисков генетического тестирования единичных клеток эмбрионов с многообразием и тяжестью патогенеза, лечения наследственных заболеваний, доказывает, что перспективы развития ПГД представляются достаточно актуальными.

Спектр наследственных заболеваний, для которых предложена преимплантационная диагностика

К настоящему времени ПГД разработана для 170 наследственных забо-

леваний [4]. Среди этих заболеваний моногенные дефекты с различным типом наследования: аутосомно-доминантным, аутосомно-рецессивным, X-сцепленным, болезни экспансии. Наибольшее число циклов проводится для муковисцидоза, гемоглобинопатий и динамических мутаций [17].

Принципиально новый способ сочетания лечения и профилактики генной патологии предложен для наследственных заболеваний, требующих трансплантации кроветворных клеток. В семьях, имеющих больного ребенка с такими заболеваниями как анемия Фанкони, талассемии, сочетание преимплантационного HLA-типирования с анализом моногенного дефекта позволяет планировать рождение здорового ребенка, стволовые клетки (пуповинная кровь) которого послужат для пересадки больному sibsu [10]. Эффективность такого подхода очевидна в связи с проблемой поиска подходящего донора и доказана примерами успешного проведения таких случаев ПГД. Необходимо учитывать, что ожидаемая вероятность HLA-совместимых эмбрионов составляет 25%. В случае, когда отбор проводится по HLA и по генотипу в отношении аутосомно-рецессивного нарушения, процент эмбрионов с нормальным генотипом и HLA-совместимых составляет порядка 19% [8].

Преимплантационная диагностика проводится для заболеваний с поздним началом [5, 17]. Предложены подходы для преимплантационной диагностики митохондриальных болезней [2].

Сотрудники Красноярского Центра репродуктивной медицины, e-mail: krasivf@kcrm.ru: **МАРКОВА Елена Викторовна** – к.б.н., зам.директора по науке, зав. лаб.; **КАЗАНЦЕВА Ольга Михайловна** – врач-генетик; **АРТЮХОВА Виктория Геннадьевна** – эмбриолог; **СВЕТЛАКОВ Анатолий Васильевич** – к.б.н., директор Центра.

Этапы проведения ПГД

Планирование ПГД

Для планирования ПГД необходимым является молекулярно-генетическое обследование супругов и выявление мутации, являющейся причиной заболевания. В ходе консультации с пациентами врач-генетик помимо других важных вопросов выясняет принципиальные с точки зрения преимплантационного ДНК-тестирования вопросы о характере наследственного заболевания, с которым обращается семья, степень генетического риска, наличие результатов молекулярно-генетических исследований.

Медико-генетическое консультирование должно быть обеспечено не только при подготовке, но и при проведении лечебного цикла. Важно учитывать, что генетическое консультирование при ПГД имеет ряд специфических особенностей, важность которых нельзя недооценивать [1, 13].

Подготовка к ПГД проводится по двум направлениям – генетическому и репродуктивному. Проведение ДНК-диагностики эмбрионов возможно только в программе ЭКО, и соответственно, необходим весь объем обследования, подготовки и консультирования для проведения лечебного цикла ЭКО. Существуют критерии, ограничивающие проведение ПГД [14].

Проведение ПГД возможно в условиях транспортной схемы, когда этап ЭКО выполняется в одном медицинском учреждении, а ПГД – в другом. Такая работа возможна исключительно при условии отлаженной схемы всех этапов работы и условий транспортировки материала эмбрионов.

Подготовительный этап

Для проведения ПГД моногенных дефектов требуется подготовительный этап. Это связано с подбором схемы генетического исследования для конкретной супружеской пары. Подбирается система информативных маркеров, сцепленных с мутацией. Для этого нужен биологический материал родителей, детей, иногда бабушек и дедушек. Для гаплотипирования могут использоваться сперматозоиды мужчины. Несмотря на то, что пациенты предоставляют результаты молекулярно-генетического исследования мутации и генетических маркеров (которые могли быть идентифицированы любым методом), проведение подготовительного этапа в любом случае необходимо, т.к. отрабатывается подход выявления мутации и маркеров, который будет эффективен на единичных клетках. Этот этап достаточно трудоемок и может

занимать от одного до трех месяцев. Только по завершении этого этапа пациенты могут вступать в лечебный цикл ЭКО-ПГД.

Вступление в лечебный цикл ИКСИ-ПГД

После того как подготовительный этап пройден, супружеская пара может начинать лечебный цикл. Для ПГД моногенных дефектов используется метод ЭКО – ИКСИ. Метод ИКСИ, первоначально разработанный для преодоления мужского бесплодия, используется в циклах ПГД для предотвращения контаминацией ДНК сперматозоидов, не участвовавших в оплодотворении.

Аспирация полярных телец и blastomeres и генетическое тестирование

Процедура ПГД включает в себя два этапа: биопсию клеток эмбрионов и их молекулярно-цитогенетическое и/или молекулярно-генетическое исследование. Основной проблемой диагностики является то, что она проводится на единичных клетках и жестко ограничена во времени.

Для ПГД используются клетки эмбриона и/или полярные тельца [3, 6, 16]. В настоящее время некоторые репродуктивные центры в мире анализируют только blastomeres, другие – полярные тельца и blastomeres. Сочетание генетического исследования blastomeres и полярных телец повышает эффективность, надежность и расширяет возможности ПГД. Генетическое тестирование полярных телец при ПГД разработано и успешно используется группой Ю. Верлинского [16]. Биопсия полярных телец для молекулярно-генетического исследования производится последовательно: первое – до проведения оплодотворения, второе – после. Полярные тельца являются побочным продуктом мейотического деления и не требуются для дальнейшего развития эмбриона. Анализ полярных телец используется для изучения генетических нарушений материнского происхождения.

Эмбрион после биопсии полярных телец продолжают культивировать и на этапе дробления на стадии 6-8 клеток проводится биопсия. Забирается один blastomere от каждого эмбриона. Большое число исследований свидетельствует о том, что проведение такой инвазивной для эмбриона микроманипуляции как аспирация одного blastomera не оказывает негативного воздействия на его дальнейшее развитие [3]. Аспирированные полярные тельца и blastomeres помещаются в

микропробирки с лизирующим буфером.

Перенос эмбрионов

По результатам генетического исследования даются рекомендации для переноса эмбрионов (эмбриотрансфера). Перед переносом эмбрионов результаты генетического исследования обсуждаются с пациентами и принимается решение о том, какие эмбрионы будут переноситься в полость матки. Перенос эмбрионов осуществляется на 5-6 сутки на стадии blastocysts.

Особенности преимплантационной ДНК-диагностики

При проведении ПГД существуют отличительные черты, как эмбриологических технологий, так и особенности ДНК-диагностики.

Эмбриологический этап ПГД характеризуется тем, что репродуктивный центр, осуществляющий лечебный цикл ЭКО/ИКСИ-ПГД, должен владеть методами культивирования эмбрионов *in vitro* до стадии blastocysts, т.к. требуется время для выполнения генетического анализа. Важнейшее значение для проведения ПГД имеет подготовка эмбриолога, который сможет квалифицированно проводить биопсии полярных телец и blastomeres.

ДНК-тестирование на единичных клетках имеет ряд принципиальных деталей, которые определяются особенностями объекта исследования.

Малое количество ДНК

Для исследования доступно минимальное количество ДНК – геном одной клетки. Минимальное количество материала определяет риск отсутствия амплификации части локусов или отдельных аллелей. Последнее явление, названное ADO (allele dropout), служит основной причиной ошибочной ДНК-диагностики генотипа эмбриона. Для предотвращения этого явления используется диагностика не одной мутации, а в комплексе со сцепленными с ней маркерами [14, 16]. После переноса полярных телец и blastomeres в лизирующий буфер, микропробирки с клетками немедленно замораживаются, хранятся и транспортируются в замороженном состоянии, для предотвращения потери материала при встряхивании. Экстремально низкие концентрации тестируемой ДНК определяют высокий риск контаминации. Необходимо не только принимать все меры для предотвращения контаминации, но и проводить постоянный контроль. Для каждого эмбриона забираются отрицательные контроли в виде среды культивирования в которой на-

ходились полярные тельца или бластомеры после аспирации.

Ограниченное время выполнения исследования

Следующей особенностью является очень ограниченное время выполнения исследования. Исследование должно быть закончено к моменту переноса эмбриона в полость матки – т.е. к пятому дню эмбрионального развития, когда эмбрион достигает стадии бластоцисты. В случае, если в ПГД проводится аспирация бластомеров, то время, за которое молекулярно-генетическое исследование должно быть выполнено, составляет максимум двое суток. Если цикл реализуется по транспортной схеме, то время на проведение исследования уменьшается на время транспортировки материала в лабораторию. Для проведения ДНК-диагностики в такие сжатые сроки необходима подготовленная схема молекулярно-генетического тестирования, которая разрабатывается на подготовительном этапе.

Методы преимплантационной ДНК-диагностики

ПГД активно используется в клинической практике специализированных генетических лабораторий и уже не является экспериментальным методом. Тем не менее, методические подходы для эффективного ДНК-анализа единичных клеток все еще совершенствуются. В связи с малым количеством генетического материала основным методом преимплантационной диагностики является метод ПЦР (полимеразной цепной реакции).

Амплификация ДНК единичных клеток

Предложено несколько способов амплификации ДНК единичных клеток. Стандартная ПЦР мало эффективна, поскольку высок риск амплификации плохого качества или отсутствия амплификации. Проблема плохой амплификации актуальна в связи с тем, что требуется проведение мультиплексной ПЦР на малом количестве ДНК, поэтому ДНК-анализ единичных клеток обычно двухэтапный. На первом этапе обеспечивается амплификация всех необходимых локусов в пробирке, в которую была помещена единичная клетка. Продукт амплификации первого этапа может в дальнейшем использоваться для исследования отдельных локусов в разных пробирках.

Для амплификации ДНК единичных клеток предлагаются такие способы как полногеномная амплификация (WGA, whole genome amplification) и nested-PCR [7, 17]. В первом случае

добиваются репрезентативной амплификации всего генома. Этот подход может быть удобен для одновременного преимплантационного анализа генных дефектов и анеуплоидий. Для анализа анеуплоидий продукт полногеномной амплификации может использоваться для сравнительной геномной гибридизации (CGH, comparative genomic hybridization). Теоретически этот подход с использованием WGA наиболее перспективен с учетом возможности автоматизации процесса, однако пока способы WGA единичных клеток разработаны не достаточно и на сегодняшний день большую эффективность доказывает nested-PCR. В данном случае целью ставится не амплификация абсолютно всех локусов генома, а мультиплексная амплификация интересующих локусов. Реакция проводится в два раунда. В первом раунде мультиплексной ПЦР амплифицируются более длинные фрагменты. Продукт первого раунда разделяется на аликваты и во втором раунде проводится уже стандартная ПЦР с амплификацией более коротких фрагментов для каждого локуса в индивидуальной пробирке. В случаях ПГД HLA+моногенный дефект в первом раунде может амплифицироваться более 20 локусов.

Детекция продуктов амплификации

Амплифицированные фрагменты анализируются различными способами. Для детекции микросателлитов используется флуоресцентное мечение ПЦР-продуктов и анализ с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе. При выявлении однонуклеотидных замен обычно применяется стандартный рестрикционный анализ с детекцией продуктов рестрикции в полиакриламидном геле. Для детекции делеций и инсерций может быть достаточно анализа длины фрагментов (ПЦР-продуктов второго раунда) или гетеродуплексного анализа с помощью гель-электрофореза. Особенностью детекции является необходимость быстрого анализа большого числа локусов за короткое время. Так, например, если в лечебном цикле получено 10 эмбрионов, то анализируются 10 первых, 10 вторых полярных телец и 10 бластомеров; всего анализ включает 30 клеток. В случае, если анализируется 10 локусов, включая мутацию, то во втором раунде необходимо проанализировать 300 образцов. С учетом того, что также анализируются отрицательный контроль для каждой клетки (по выборочным локусам) и положительные контроли число проб для детекции велико. В связи с этим

предпочтительны автоматизированные способы детекции.

Разрабатываются микрочиповые технологии для анализа моногенных дефектов. Развитие в преимплантационной диагностике получают методы MDA (multiple displacement amplification) и real-time PCR [15]. Имеются сведения об успешных циклах ПГД с применением MDA для ряда заболеваний, в частности, миодистрофии Дюшенна, синдрома Моркио [9, 11].

Литература

1. Светлаков А.В. Вопросы медико-генетического консультирования при преимплантационной генетической диагностике / А.В. Светлаков [и др.] // Медицинская генетика - 2008. - Т.7, №12. - С.12-24.
2. Bredenoord A.L. PGD to reduce reproductive risk: the case of mitochondrial DNA disorders / A.L. Bredenoord [et al.] // Human Reproduction. - 2008. - Vol.23, № 11. - P.2392-2401.
3. Gianaroli L. Preimplantation genetic diagnosis: polar body and embryo biopsy / L. Gianaroli // Human Reproduction. - 2000. - Vol.15, Suppl.4. - P.69-75.
4. Guidelines for good practice in PGD: programme requirements and laboratory quality assurance // Reprod Biomed Online. - 2008. - Vol.16, №1. - P.134-147.
5. Harper J.C. ESHRE PGD Consortium data collection VII: cycles from January to December 2004 with pregnancy follow-up to October 2005 / J.C. Harper [et al.] // Human Reproduction. - 2008. - Vol.23, №4. - P.741-755.
6. Montag M. Polar body biopsy: a viable alternative to preimplantation genetic diagnosis and screening / M. Montag, K. van der Ven, B. Rosing B, H. van der Ven // Reprod Biomed Online. - 2009. - Vol. 18, Suppl 1. - P. 6-11.
7. Peng W. Whole genome amplification from single cells in preimplantation genetic diagnosis and prenatal diagnosis / W. Peng, H. Takabayashi, K. Ikawa // Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. - 2007. - Vol.131, №1. - P.13-20.
8. Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion // Fertility and Sterility. - 2007. - Vol.88, №6. - P.1497-1504.
9. Qubbaj W. Preimplantation genetic diagnosis of Morquio disease / W. Qubbaj [et al.] // Prenat Diagn. - 2008. - Vol.28, №10. - P.900-3.
10. Rechitsky S. Preimplantation genetic diagnosis with HLA matching / S. Rechitsky // Reprod Biomed Online. - 2004. - Vol.9, №2. - P.210-221.
11. Ren Z. Preimplantation genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy by multiple displacement amplification / Z. Ren [et al.] // Fertil Steril. 2009. - Vol.91, №2. - P.359-64.
12. Simpson J.L. Genetics in obstetrics and gynecology / J.L. Simpson, S. Elias. - Saunders (An Imprint of Elsevier, USA). - 2003. - 484p.
13. Soini S. The interface between assisted reproductive technologies and genetics: technical, social, ethical and legal issues / S. Soini [et al.] // European Journal of Human Genetics. - 2006. - №14. - P. 588-645.
14. Thornhill A.R. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)' / A.R. Thornhill [et al.] // Human Reproduction. - 2005. - Vol.20, №1. - P.35-48.
15. Traeger-Synodinos J. Real-time PCR for prenatal and preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases / J. Traeger-Synodinos // Mol Aspects Med. - 2006. - Vol.27, №2-3. - P.176-91.
16. Verlinsky Y. Atlas of preimplantation genetic diagnosis / Y. Verlinsky, A. Kuliev. - Taylor and Francis, 2005. - 288 p.
17. Verlinsky Y. Practical preimplantation genetic diagnosis / Y. Verlinsky, A. Kuliev. - Springer, 2005. - 198 p.