

УДК: 57.085.23

Влияние кроссинговера на распределение генов бета-глобина между полярными тельцами и ооцитом и клинические испытания предимплантационной генетической диагностики с использованием анализа полярных телец
О.Верлинский

*Чикагский институт репродуктивной генетики (Чикаго, США)
Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)*

Целью исследований было реализовать на практике предимплантационную генетическую диагностику на основе генетического анализа ДНК первого и второго полярных телец при различных мутациях гена бета-глобина. Впервые за счет использования полярных телец и современных ДНК-технологий проводили генетический анализ ооцитов без необходимости в дальнейшем проведения биопсии бластомеров у ранних эмбрионов. Получены данные, характеризующие высокую степень кроссинговера при различных мутациях гена бета-глобина, и тем самым обоснована необходимость исследования второго полярного тельца для постановки правильного диагноза.

Ключевые слова: *предимплантационная генетическая диагностика, талассемии, ген бета-глобина, ооциты, полярные тельца, кроссинговер.*

Вплив кросинговеру на розподіл генів бета-глобіну між полярними тільцями і ооцитом та клінічні випробування передімплантаційної генетичної діагностики з використанням аналізу полярних тілець
О.Верлинський

Метою досліджень було реалізувати на практиці передімплантаційну генетичну діагностику на основі генетичного аналізу ДНК першого і другого полярних тілець при різних мутаціях гена бета-глобіну. Вперше за рахунок використання полярних тілець і сучасних ДНК-технологій проводили генетичний аналіз ооцитів без необхідності у подальшому проведення біопсії бластомерів у ранніх ембріонів. Отримані дані, що характеризують високий ступінь кросинговеру при різних мутаціях гена бета-глобіну, і тим самим обґрунтована необхідність дослідження другого полярного тільця для постановки правильного діагнозу.

Ключові слова: *передімплантаційна генетична діагностика, таласемії, ген бета-глобіну, ооцити, полярні тільця, кросинговер.*

The influence of crossing-over on distribution of beta-globin genes between polar bodies and oocyte and clinical trials of preimplantation genetic diagnosis using polar bodies analysis
O.Verlinsky

The aim of studies was practical realization of preimplantation genetic diagnosis on the basis of genetic analysis of DNA of first and second polar bodies at different mutations of beta-globin gene. At first using polar bodies and contemporary DNA technologies genetic analysis of oocytes was carried out without necessity in future to accomplish blastomere biopsy in early embryos. There have been obtained the data that indicate high level of crossing-over at different mutations of beta-globin gene and justify necessity to study the second polar body for correct diagnosis.

Key words: *preimplantation genetic diagnosis, thalassaemias, beta-globin gene, oocytes, polar bodies, crossing-over.*

Введение

Предимплантационная генетическая диагностика (ПГД) – одно из самых молодых и бурно развивающихся направлений репродуктивной медицины, имеющее целью обнаружение или исключение наследственных заболеваний (Rechitsky et al., 2006; Kuliev et al., 2005; Verlinsky et al., 2001a, b).

Рождение детей, свободных от генетических отклонений, является актуальной проблемой, в решении которой может быть успешно применено комплексное исследование генотипа первого (IPB) и второго (IIPB) полярных телец (PB – polar body) в клинических условиях (Verlinsky et al., 2002).

Целью исследований было впервые реализовать на практике ПГД на основе генетического анализа ДНК IPB и IIPB путем изучения влияния кроссинговера на распределение генов, несущих наследственные мутации гена бета-глобина, между PB и ооцитом, постановки полимеразно-цепной реакции (PCR – polymerase chain reaction), исследования выпадения аллелей в гетерозиготных фибробластах кожи, в гетерозиготных бластоцистах и в PB при проведении PCR, дальнейшего исследования эмбрионов, полученных из ооцитов с соответствующими генетическими изменениями, по результатам анализа IPB и IIPB. Необходимость анализа IIPB вызвана возможностью кроссинговера, при котором IPB будет гетерозиготным.

Материалы и методы

В исследованиях использованы одиночные фибробласты, выделенные из культур клеток кожи пациентов, ооциты пациентов, гетерозиготных в отношении различных мутаций гена бета-глобина, сперма супругов.

Всего было использовано 514 одиночных фибробластов, выделенных из культур клеток кожи от лиц, гетерозиготных в отношении следующих 5 типов мутаций бета-глобина: IVS I–1; IVS I–6; IVS I–110; IVS II–745; Кодон 39.

Этапы проведения исследований.

1. Проверка экспериментальной системы для одиночного гетерозиготного фибробласта из культуры клеток кожи пациентов – носителей различных видов талассемии. Анализ эффективности амплификации при проведении PCR и частоты выпадения аллели (ADO – allele dropout) на 6% полиакриламидных гелях.

2. Проведение суперовуляции, трансвагинальная пункция фолликулов яичников для отбора достаточного количества ооцитов. Получение сперматозоидов партнера. Оплодотворение зрелых ооцитов сперматозоидами партнера с последующей оценкой оплодотворения через 15–18 часов.

3. Биопсия IPB и IIPB по предложенной нами методике с последующим их лизисом с целью выделения ДНК и удаления из полученного материала возможных ингибиторов, проведение PCR, анализ полученных продуктов амплификации после воздействия рестриктазами на ампликоны на 6% полиакриламидных гелях.

4. Перенос в полость матки пациентам протестированных «здоровых» ранних эмбрионов.

5. Дополнительный подтверждающий анализ протестированных «больных» эмбрионов путем биопсии бластомеров, их лизиса, проведения PCR, рестриктного анализа.

Статистический анализ производили методом χ -квадрата с помощью компьютерной программы Epistat.

Результаты и обсуждение

Вначале эффективность амплификации при проведении PCR и анализа ADO были изучены на одиночных фибробластах, выделенных из культур клеток кожи пациентов (табл. 1).

Таблица 1.
Выпадение аллелей у гетерозиготных одиночных фибробластов с различными мутациями талассемии

Мутация	Количество фибробластов	Подверглось амплификации	Общее количество выпадения аллелей
IVS I–1 (Г→А)	39	35 (89,7%)	2 (5,7%)
IVS I–6 (Т→Ц)	91	85 (93,4%)	9 (10,6%)
IVS I–110 (Г→А)	289	276 (95,5%)	28 (10,1%)
IVS II–745 (Ц→Г)	50	47 (94,0%)	3 (6,4%)
Кодон 39 (Ц→Т)	45	41 (91,1%)	2 (4,9%)
Всего	514	484 (94,2%)	44 (9,1%)

Из общего количества – 514 одиночных фибробластов – подверглась амплификации путем гнездовой PCR ДНК 484 фибробластов (94,2%). При этом частота амплификаций колебалась от 89,7% в

случае мутации IVS I-1 (Г→А) до 95,5% в случае мутации IVS I-110 (Г→А). Эти различия статистически не достоверны (p=0,526). Выпадение аллелей в целом наблюдалось в 44 фибробластах (9,1%), с частотой от 4,9% (самая низкая) в случае мутации Кодона 39 (Ц→Т) до 10,6% (самая высокая) в случае мутации IVS I-6 (Т→Ц). Эти различия также статистически не достоверны (p=0,665). Для того чтобы определить, зависит ли частота выпадения аллелей от типа мутации гена бета-глобина, потребуется больше данных.

Мы впервые описали, получили и испытали в клинических условиях различные системы внутренних и внешних праймеров для тестирования разных мутаций талассемии, а также ряд наружных и внутренних праймеров к двум полиморфным маркерам – 5'-globin STR и 3'-globin STR (STR – short tandem repeat), непосредственно сцепленных с геном бета-глобина (LOC – 11 p15.5) (табл. 2).

Таблица 2.

Последовательности праймеров для талассемии

Мутация (локус)	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'→3')	Размер праймера (bp)	Рестриктаза, воздействующая на ампликон
IVS I-110 (Г→А)	Наружные: C ggccaatctactcccaggag D acatcaagggtcccatagac Внутренние: LH atgtggagacagagaagactcttgggtt IVS I – 110R ccaggatcctaagggtgggaaaatagat	597 87	MboI
IVS I-6 (Т→Ц)	Наружные: C ggccaatctactcccaggag D acatcaagggtcccatagac Внутренние: N1 cagggcagagccatctattgctta N2 gcatcaggagtggacagatcccca	597 363	SfaNI
IVS I-1 (Г→А)	Наружные: C ggccaatctactcccaggag D acatcaagggtcccatagac Внутренние: N1 cagggcagagccatctattgctta N2 gcatcaggagtggacagatcccca	597 363	BspMI
Кодон 39 (Ц→Т)	Наружные: C ggccaatctactcccaggag D acatcaagggtcccatagac Внутренние: LH atgtggagacagagaagactcttgggtt N2 gcatcaggagtggacagatcccca	597 148	MaeI
IVS II-745 (Ц→Г)	Наружные: THAL 1 ctaatctcttcttccagg THAL 2 aaccttaatagaaattgg Внутренние: THAL 3 ataacagtgataattctgg THAL 4 aaagcgaacttagtgatc	454 362	RsaI
5'-globin STR	Наружные: H-1 cctgatgagggttgagacag H-2 ctgccctacctggaac Внутренние: H-3 atagaggatccagtttctttg H-4 agctctaacactctgaaactacg	302–310 102–110	
3'-globin STR	Наружные: THO 6 ttcccaggctctagcagc THO 7 agctcccgattatccagc Внутренние: THO 4 aggtatctgggctctgg THO 5 ctccgagtgacaggtcac	222–240 115–131	

В целом, большинство ооцитов, исходя из анализа IPB (табл. 3), были гетерозиготными в отношении генов-мутантов (87 из 118). Частота кроссинговера при этом составила 73,7%. Соответственно был установлен диагноз в отношении 31 ооцита, или в 26,3% от общего количества ооцитов, анализируемых по IPB.

Диагноз в отношении 86 ооцитов из 118 проверенных на наличие мутаций гена бета-глобина методом IPB, как мы и предполагали, полностью подтвердился при одновременной амплификации сцепленных полиморфных маркеров 5'-globin STR и 3'-globin STR.

Генотип гамет, получающихся из гетерозигот, можно оценить только путем исследования их ИПВ. Из 89 ооцитов, у которых был проведен анализ ИПВ, 78 были проверены методами и IPB, и ИПВ (табл. 4).

Таблица 3.

Двухэтапный анализ РВ и дальнейшее наблюдение диагноза у эмбрионов с талассемией

Мутация (локус)	Всего ооцитов (число амплификаций)	Ооциты после PCR IPB		Ооциты после PCR IIPB	Ооциты после PCR IPB и PCR IIPB		Эмбрионы	
		гетерозиготные	гомозиготные		всего	число выпадений аллелей	изученные	подтвержденные
IVS II-745 (Ц→Г)	54	43	11	49	38	1	25	25
IVS I-110 (Г→А)	64	44	20	40	40	4	26	26
Всего:	118	87	31	89	78	5	51	51
5'-globin STR	76	57	19	61	54	2	39	39
3'-globin STR	10	8	2	10	8	1	5	5
Всего:	86	65	21	71	62	3	44	44

Таблица 4.

Двухэтапный анализ РВ, предсказывающий генотип ооцита после первого и второго мейотического деления

Мутация (локус)	Ооциты после PCR IPB и PCR IIPB	Ооциты гомозиготные после PCR IPB		Ооциты гомозиготные после PCR IIPB		Всего ооцитов с предсказанным генотипом	
		нормальные	мутантные	нормальные	мутантные	нормальные	мутантные
IVS II-745 (Ц→Г)	38	1	8	11	16	12	24
IVS I-110 (Г→А)	40	5	7	14	14	19	21
Всего:	78	6	15	25	30	31	45
5'-globin STR	54	11	2	20	19	31	21
Hum THO1 STR	8	1	1	3	3	4	4
Всего:	62	12	3	23	22	35	25

Был окончательно установлен диагноз, в случае мутации талассемии IVS II-745 (Ц→Г), в отношении 36 ооцитов, 94,7% от их общего количества – 38 ооцитов, анализируемых по IPB и IIPB. Большинство ооцитов, исходя из анализа IPB и IIPB, оказались мутантными (24 из 38 анализируемых, или 63,2%). Соответственно 12 ооцитов, или 36,8%, в своем генотипе не содержали мутации талассемии IVS II-745 (Ц→Г) и являлись пригодными для дальнейшей их трансплантации в организм пациентов.

Из 161 бластомеров, полученных из этих 37 эмбрионов, амплификация обеих аллелей происходила у 132 из 161 (81,4%) бластомеров, анализируемых на мутации, приводящие к талассемии, и у 41 из 51 (81,9%) бластомеров, анализируемых на полиморфные маркеры, что показывает большой риск неверного диагноза при ПГД на основе бластомеров (табл. 5). Нами была отмечена также более высокая ADO в бластомерах, чем в IPB, но это различие не достигло уровня статистической значимости. Применение одновременной амплификации сцепленных полиморфных маркеров имеет огромное значение для снижения числа необнаруженных выпадений аллелей и риска постановки неправильного диагноза, особенно в случаях, когда родители являются носителями различных мутаций гена бета-глобина.

Таблица 5.
Выпадение аллелей у гетерозиготных по талассемии бластомеров в результате амплификации

Мутация (локус)	Проверено эмбрионов	Аспирировано BL	Амплификация A1 и A2	Амплификация A1	Амплификация A2	ADO
IVS II-745 (Ц→Г)	20	85	74	80	79	11
IVS I-110 (Г→А)	17	76	58	68	66	18
Всего:	37	161	132	148	145	30
5'-globin STR	10	51	41	45	47	10

На основании проведенных исследований нами в институте г. Чикаго был внедрен в клиническую практику анализ по IPB и IIPB для ПГД бета-талассемий.

Из зафиксированных 76 беременностей уже родилось 68 детей, ожидаемых родов – 4. Во всех 100% случаях были подтверждены диагнозы, предсказанные при анализе PB, что показывает точность анализа по IPB и IIPB для ПГД различных наследственных заболеваний.

Таким образом, показана точность и обоснованность применения методики последовательного анализа PB для ПГД генетических нарушений, причем точность повышается благодаря использованию сцепленных маркеров. Из-за повышенной частоты выпадения аллелей, наблюдающейся у бластомеров по отношению к PB, мы не можем рекомендовать анализ бластомеров как единственный метод для применения при ПГД генетических нарушений в случаях, когда оба родителя имеют различные мутации или в случае доминантных нарушений.

Впервые за счет использования IPB и IIPB, используя современные ДНК-технологии, проводили генетический анализ ооцитов без необходимости в дальнейшем проведения биопсии бластомеров у ранних эмбрионов и не нанося при этом ущерба их жизнеспособности. Это дало возможность проследивать распределение нормальных и ненормальных аллелей еще на стадии мейоза и отбирать для дальнейшего оплодотворения только те яйцеклетки, которые содержат нормальные гены. Нами получены новые данные, характеризующие высокую степень проявления кроссинговера при различных мутациях гена бета-глобина, и тем самым обоснована необходимость исследования IIPB для постановки правильного диагноза. Разработаны методы микрохирургического отбора IPB и IIPB. Получен ряд праймеров для исследования некоторых видов мутаций талассемии. Усовершенствована PCR при проведении двухэтапного анализа генотипа одиночной клетки, в данном случае – PB.

В итоге нами впервые подтверждена в клинических условиях возможность ПГД по PB без необходимости дальнейшего вмешательства в развивающийся эмбрион для биопсии бластомеров и проведения пренатальной диагностики в период беременности.

Список литературы

- Kuliev A., Rechitsky S., Verlinsky O. et al. Preimplantation diagnosis and HLA typing or haemoglobin disorders // *Reprod. Biomed Online*. – 2005. – Vol.11 (3). – P. 362–370.
- Rechitsky S., Kuliev A., Sharapova T. et al. Preimplantation HLA typing with aneuploidy testing // *Reprod. Biomed Online*. – 2006. – Vol.12 (1). – P. 89–100.
- Verlinsky Y., Rechitsky S., Verlinsky O. et al. Preimplantation diagnosis for long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency // *Reprod. Biomed Online*. – 2001a. – Vol.2 (1). – P. 17–19.
- Verlinsky Y., Rechitsky S., Verlinsky O. et al. Preimplantation diagnosis for p53 tumour suppressor gene mutations // *Reprod. Biomed Online*. – 2001b. – Vol.2 (2). – P. 102–105.
- Verlinsky Y., Rechitsky S., Verlinsky O. et al. Polar body-based preimplantation diagnosis for X-linked disorders // *Reprod Biomed Online*. – 2002. – Vol.4 (1). – P. 38–42.

Представлено: С.І.Ковтун / Presented by: S.I.Kovtun
Рецензент: Л.І.Воробйова / Reviewer: L.I.Vorobyova
Подано до редакції / Received: 14.11.2011