

23. *Kwiterovich P. O., Jr.* Pediatric implications of heterozygous familial hypercholesterolemia. Screening and dietary treatment // *Arteriosclerosis*.— 1989.— 9, Suppl. 1.— P. I-111 — I-120.
24. *Witztum J. L.* Current approaches to drug therapy for the hypercholesterolemic patients // *Circulation*.— 1989.— 80, N 5.— P. 1101—1114.
25. *Cuthbert J. A., Lipsky P. E.* Identification of Low density lipoprotein receptor abnormalities by assaying functional receptors on proliferating lymphocytes // *Arteriosclerosis*.— 1989.— 9, Suppl. 1.— P. I-43 — I-49.
26. *Deletion* in the first cysteine-rich repeat of the low density lipoprotein receptor impairs its transport but not lipoprotein binding in fibroblasts from a subject with familial hypercholesterolemia / E. Leitersdorf, H. H. Hobbs, A. M. Fourie et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1988.— 85, N 21 — P. 7912—7916.
27. *Esser V., Russell D. W.* Transport deficient mutations in the low density lipoprotein receptor. Alterations in the cysteine rich and cysteine poor regions of the protein block intracellular transport // *J. Biol. Chem.*— 1988.— 263, N 26.— P. 13276—13281.
28. *Deletion* of exon encoding a cysteine-rich repeat of LDL receptor alters its binding specificity in a subject with familial hypercholesterolemia / H. H. Hobbs, M. S. Brown, J. L. Goldstein, D. W. Russell // *Ibid.*— 1986.— 261, N 28.— P. 13114—13120.
29. *Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor* / V. Esser, L. E. Limbird, M. S. Brown et al. // *Ibid.*— 1988.— 263, N 26.— P. 13282—13290.
30. *A 31-year old woman with homozygous familial hypercholesterolemia without significant lesions in the coronary arteries* / S. Yamashita, Y. Ueyama, T. Funahashi et al. // *Atherosclerosis*.— 1986.— 62, N 2.— P. 117—121.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР. Ленинград

Получено 05.07.90

УДК 616-055.5/7-084:614:061.14

**Т. К. Кащева, Т. В. Кузнецова, Ю. К. Рамша,
В. М. Лебедев, Т. Э. Иващенко, В. С. Баранов**

ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ В ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ПОЛА ПЛОДА И ГЕНОТИПИРОВАНИИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Работа суммирует результаты анализа пола плода с помощью полимеразной цепной реакции синтеза ДНК (ПЦР) и наборов Y-специфичных олигонуклеотидов в клетках биоптата хориона, амниоцитах, в материале цитогенетических препаратов и образцах периферической крови матери. В специальных сериях опытов методом ПЦР определено наличие Y-специфичных последовательностей в клетках крови индивидуумов с нарушениями половой дифференцировки, а также в отдельных сперматозоидах человека. Обсуждаются перспективы использования неинвазивных методов для определения пола внутриутробного плода при помощи ПЦР и олигонуклеотидов, специфичных для X и Y хромосом.

Введение. Полимеразная цепная реакция синтеза ДНК — реакция специфической амплификации (РСА) — благодаря своей простоте и исключительно высокой чувствительности широко применяется в медицинской генетике, в том числе в пренатальной диагностике наследственных болезней [1, 2]. Учитывая большую распространенность X-сцепленных наследственных заболеваний, а также сравнительно высокую частоту числовых и структурных перестроек половых хромосом, проблема точной диагностики генетического пола на разных стадиях онтогенеза человека сохраняет свою актуальность. Между тем, диагностика пола по интерфазным ядрам амниоцитов или клеток хориона не всегда надежна, а метафазные пластинки в биоптате хориона и культурах амниоцитов нередко отсутствуют.

Принципиально новые возможности в этом направлении открывают X- и Y-хромосомоспецифичные зонды и ПЦР. Разработаны удобные системы олигонуклеотидов, с помощью которых в ПЦР можно осуществить направленную амплификацию различных участков Y-хромосомы,

© Т. К. КАЩЕВА, Т. В. КУЗНЕЦОВА, Ю. К. РАМША, В. М. ЛЕБЕДЕВ,
Т. Э. ИВАЩЕНКО, В. С. БАРАНОВ, 1991

несущих уникальную для этой хромосомы ДНК-последовательность [3, 4]. Имеются данные, что в крови беременных женщин циркулируют клетки плода [5], которые могут быть использованы для кариотипирования [6] и диагностики пола [7]. Естественно, что применение неинвазивных методов открывает широкие перспективы для пренатальной диагностики наследственных заболеваний.

В задачу данной работы входило определение пола плода молекулярными методами при помощи Y-специфичных олигопраймеров на материале хорионбиоптата и амниоцитов, в образцах периферической крови беременных женщин, а также наличия Y-специфичных последовательностей у больных с нарушениями половой дифференцировки и в индивидуальных сперматозоидах нормальных особей.

Материалы и методы. Работа выполнена на образцах ДНК, полученных стандартным методом из лимфоцитов периферической крови женщин 8—40 недель беременности [8].

ДНК из биоптатов хориона и амниоцитов выделяли с использованием протеиназы К [8].

Для проведения РСА на материале цитологических препаратов в стерильных условиях под контролем микроскопа тонкой иглой снимали со стекла клетки и ядра, которые помещали в реакционную смесь, обработанную *EcoRI* (см. ниже).

Хромосомные препараты готовили из ФГА-стимулированных лимфоцитов крови, прямым методом из клеток биоптата хориона [9] и из амниоцитов. Хромосомы окрашивали флюорохромом Хехст 33258 или по Гимза и анализировали под микроскопом.

В специальной серии опытов при помощи пастеровской пипетки под контролем фазово-контрастного микроскопа (Х160) из разбавленной суспензии отбирали единичные сперматозоиды, промывали в стерильной деионизованной воде, после чего сперматозоид лизировали и без обработки протеиназой К помещали в реакционную смесь.

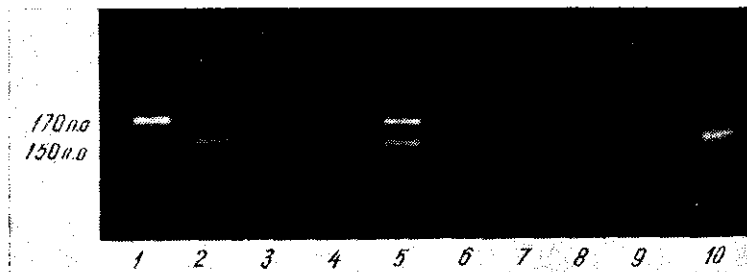
Реакционную амплификацию (ПЦР синтез ДНК) проводили на автоматическом термоциклере РНС-1 («Techne», Англия) с помощью термостабильной ДНК-полимеразы *Thermus thermophilus*. Для выявления Y-специфичных последовательностей использовали два набора праймеров Y1.1 и Y1.2 [3], Y1 и Y2 [4]. Y1.1 и Y1.2 соответствуют последовательности ДНК, гомологичной фрагменту ДНК длинного плеча Y-хромосомы; Y1 и Y2 — фрагменту ДНК, локализованному в околоцентромерной области Y-хромосомы. Для увеличения специфичности и чувствительности РСА помимо пары основных олигопраймеров Y1.1 и Y1.2 использовали также и пару внутренних (nested) праймеров [7]. Все праймеры синтезированы НПК «Энзим» (Вильнюс). РСА проходила в следующем режиме: денатурация 94—98 °С (30 с); отжиг — 54 °С (30 с); и синтез — 72 °С (30 с). В случае использования внутренних праймеров после 35 циклов амплификации с основными праймерами отбирали аликвоту 1 мкл и проводили дополнительно 26 циклов с добавлением свежих реагентов.

При определении пола плода по клеткам периферической крови матери с целью устранения возможных артефактов, связанных с загрязнением, реакционную смесь обрабатывали *EcoRI* и затем инактивировали нагреванием до 94 °С в течение 10 мин непосредственно перед внесением образцов тестируемой ДНК.

Результаты и обсуждение. Комбинированное молекулярно-цитогенетическое исследование плода проведено у 14 беременных женщин с высоким риском рождения детей с гемофилией А или миодистрофией Дюшенна. Образцы ДНК плода и хромосомные препараты готовили из биоптата хориона 9—11 недель беременности) либо из амниоцитов (17—18 недель) (рисунок, 5—10). Молекулярными методами в 11 случаях установлено наличие плода мужского пола и в трех — женского. Интересно отметить, что в трех случаях из-за нехватки материала хориона для реакции амплификации использовали соскоб с цитологических препаратов. Результаты РСА материала соскоба полностью со-

ответствовали данным хромосомного анализа, что позволило нам с его помощью не только определять пол плода, но при необходимости диагностировать муковисцидоз, миодистрофию Дюшенна и гемофилию А.

Метод амплификации соскоба цитологических препаратов был применен и для анализа присутствия материала Y-хромосомы у пациентов с нарушениями половой дифференцировки (табл. 1). Исследования проведены на семи индивидуумах, два фенотипа мужских и пять — женских. В трех случаях наблюдалось явное несоответствие фенотипа генотипу (случаи 1, 2 и 7), в трех — хромосомный мозаицизм,



Определение наличия Y-хромосомы при помощи специфических олигопраймеров и ПЦР синтеза ДНК: 1 — синдром тестикулярной феминизации (кариотип XY, праймеры Y1.1 и Y1.2; амплификат 170 п. о.); 2 — фенотипически нормальный мужчина (кариотип XY, праймеры Y1.1 и Y1.2; амплификат 150 п. о.); 3, 4 — фенотипически нормальные женщины (отсутствие специфической амплификации); 5 — пренатальная диагностика гемофилии А (плод мужского пола; кариотип XY, 18-я неделя беременности, амниоциты, праймеры Y1, Y2 и Y1.1, Y1.2); 6—9 — пренатальная диагностика гемофилии А (плоды женского пола, хорионбиопсия, 9—11-я неделя беременности); 10 — плод мужского пола с гемофилией А (пренатальная диагностика; 18-я неделя беременности, плацентоцентез, праймеры Y1.1 и Y1.2)

причем у двух фенотипически нормальных женщин присутствовал клон клеток с хромосомным фрагментом. Методом ПЦР с использованием олигопраймеров, соответствующих гетерохроматиновому району Y-хромосомы, установлено наличие материала Y-хромосомы у индивидуума с синдромом тестикулярной феминизации (№ 1) (рисунок, 1), а также у особи-мозаика (?) (№ 5), у которой фрагмент неясной этиологии, как показывают эти данные, представляет собой участок длинного плеча Y-хромосомы. Во всех остальных случаях фрагмент Y-хромосомы, соответствующий участку амплификации, не обнаружен. Точная молекулярная диагностика этих случаев нарушения половой дифференцировки требует использования олигопраймеров, специфичных для других последовательностей Y-хромосомы, и применения Y-хромосомоспецифичных зондов. Таким образом, современные молекулярные подходы открывают широкие возможности для точной диагностики генетического пола и изучения проблем половой дифференцировки.

Особый интерес для пренатальной диагностики представляет разработка метода неинвазивного определения пола плода. Реальными предпосылками для проведения таких исследований явились данные о наличии клеток плода в периферической крови матери [5] и высокая специфичность ПЦР [4]. В 1988 году появилось сообщение о возможности кариотипирования плода по клеткам в крови матери [6], а в 1989 году сразу в нескольких лабораториях предпринята попытка неинвазивного определения пола внутриутробного плода при помощи РСА и Y-специфичных олигопраймеров [7]. Мы обследовали 50 женщин на различных сроках беременности (8—40 недель), в том числе 21 — беременную девочкой и 29 — беременных мальчиками (табл. 2). Осуществлены три варианта амплификации: два с олигопраймерами для выявления центромерной области и специфичных для длинного плеча Y-хромосомы отдельно, а также один — с использованием основных и внутренних праймеров. При беременности мальчиками в 24 из 29 случаев пол был определен у плода правильно, что составляет 83,5%. К сожалению, при беременности девочками почти в половине случаев

Таблица 1
 Обследование пациентов с нарушениями
 половой дифференцировки
 Molecular analysis of patients with abnormal
 sex differentiation

№ случая	Фенотип	Картиотип	Наличие Y-последовательности
1	Женский	46XY	+
2	Мужской	46XX	—
3	Женский	45XO/45Xi	—
4	»	46XX/46XY(?)	—
5	»	46XX	—
6	»	45XO/45Xi	+
7	Мужской	46XX	—

Таблица 2
 Результаты определения пола плода
 по периферической крови беременных
 женщин методом ПЦР синтеза ДНК
 Prenatal sex determination by DNA
 amplification from maternal peripheral
 blood

Праймеры, специфичные для Y-последовательности (длина, п.о.)	Пол плода			
	Женский		Мужской	
	Всего	Пол установлен	Всего	Пол установлен
Y1.1, Y1.2 (149)	12	7	15	13
Y1.1, Y1.2+ +Y1.3, Y1.4 (102)	2	1	2	1
Y1, Y2 (170)	7	4	12	10

меров и РСА. Важно также выяснить, начиная с какого срока беременности такая диагностика может быть применена. Тем не менее уже сейчас результаты определения пола при беременности мальчиком представляются вполне обнадеживающими и свидетельствуют о принципиальной возможности выявления даже единичных клеток плода в образцах крови матери методом ПЦРСД.

В реальности такого подхода убеждают и результаты типирования индивидуальных спермиев человека для обнаружения Y-специфичного материала. Такие эксперименты проведены на восьми спермиях, в пяти из них методом ПЦР обнаружено наличие Y-специфичной последовательности, т. е. они несут Y-хромосому, а в трех — Y-хромосома не определена. Учитывая быстро возрастающую роль оплодотворения *in vitro* с последующей трансплантацией зародыша человека в плане лечения многих форм бесплодия, особое значение приобретает пренатальная диагностика на доимплантационных стадиях развития. Пол плода и многие наследственные заболевания реально могут быть определены молекулярными методами уже на индивидуальных бластомерах [10].

Перспективным для этой цели является также генотипирование полярных телец. Естественно, что типирование отдельных сперматозоидов важно не только для демонстрации уникальных возможностей молекулярных методов, но имеет существенное значение для составления генетических карт человека [10] и решения проблемы преизготической селекции гамет в медицинской генетике, а также в исследованиях по генной дактилоскопии.

Резюме

Робота підсумовує результати аналізу статі плоду за допомогою полімеразної ланцюгової реакції синтезу ДНК (ПЛР) та наборів Y-специфічних олігопраймерів у клітинах біоптату хоріону, амніоцитах, у матеріалі цитогенетичних препаратів та зразках периферичної крові матері. У спеціальних серіях дослідів методом ПЛР визначали наявність Y-специфічних послідовностей у клітинах крові індивідуумів з розладом

статевую диференційність, а також у окремих сперматозоїдах людини. Обговорюються перспективи використання неінвазивних методів для визначення статі внутрішньоутробного плоду за допомогою ПЛР і олігопраймерів, специфічних для X- та Y-хромосом.

Summary

The results of fetus sexing by polymerase chain reaction (PCR) with different Y chromosome specific oligoprimers in chorionic villi samples, amniocytes, in chromosome preparation slide scratches as well as in maternal blood samples are summarised. Detection of Y chromosome specific sequences in individual human sperms as well as in persons with phenotypic and genotypic derivations in sex differentiation are carried out. Perspective for noninvasive intrauterine fetus sexing by means of PCR with X and Y chromosome specific oligoprimers are discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia* / R. Saiki, S. Scharf, F. Faloona et al. // *Science*.— 1987.— 230, N 18.— P. 1350—1354.
2. *Prenatal diagnosis of cystic fibrosis for detection of KM-19 polymorphism* / G. L. Feldman, R. Williamson, A. L. Beaudet, W. E. O'Brien // *Lancet*.— 1988.— N 8610.— P. 102.
3. *Kogan S. C., Doneity M., Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences* // *New Engl. J. Med.*— 1987.— 317, N 16.— P. 985—990.
4. *Y-90, a DNA probe for the sensitive detection of Y-derived marker chromosomes and mosaicism* / U. Müller, T. A. Donlon, S. H. Kunkel et al. // *Hum. Genet.*— 1987.— 75, N 2.— P. 109—113.
5. *Fetal lymphocytes and trophoblast cells in the maternal circulation* / A. E. Covone, D. Mutton, A. D. van Dam et al. // *Proc. of the Int. symp. on early prenatal diagnosis: present and future (12—13 October 1984)*.— Naples, 1984.— P. 108.
6. *Selypes A., Lorencz R. A noninvasive method for determination of the sex and karyotype of the fetus from the maternal blood* // *Hum. Genet.*— 1988.— 79, N 6.— P. 357—359.
7. *Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood* / Y.-M. D. Lo, J. S. Wainscoat, M. D. G. Gillmer et al. // *Lancet*.— 1989.— N 8676.— P. 1363—1365.
8. *Маниагис Т., Фрич Э., Сембрук Дж. Молекулярное клонирование*.— М.: Мир, 1986.— 420 с.
9. *Баранов В. С. Метод стряхивания — отпечатывания — надежный способ приготовления препаратов хорниона* // *Цитология*.— 1989.— 31, № 2.— С. 251—254.
10. *Fine structure genetics mapping of human chromosomes using the polymerase chain reaction on single sperm: experimental design considerations* / M. Boehnke, N. Arnheim, H. Li, F. S. Collins // *Amer. J. Hum. Genet.*— 1989.— 45, N 1.— P. 21—32.

Ин-т акушерства и гинекологии АМН СССР, Ленинград

Получено 05.07.90

УДК 577.213.3

**Т. Э. Иващенко, Л. А. Лившиц, С. А. Гембовская, Д. С. Амоаший,
М. Т. Веножинскис, В. Н. Горбунова, В. С. Баранов**

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ДЕЛЕЦИИ F508 У БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ *

При помощи реакции специфической амплификации изучена частота делеции F508 у 114 больных муковисцидозом (МВ) северо-западной части СССР, 31 — с Украины, 14 — из Молдавии и 8 — из Литвы. Установлено, что среди больных смешанной формой МВ делеция F508 встречается у 65 % пациентов северо-западного региона и у

* Работа частично финансируется Всемирной Организацией Здравоохранения (Грант G 3/181/139).

© Т. Э. ИВАЩЕНКО, Л. А. ЛИВШИЦ, С. А. ГЕМБОВСКАЯ, Д. С. АМОАШИИ,
М. Т. ВЕНОЖИНСКИС, В. Н. ГОРБУНОВА, В. С. БАРАНОВ, 1991