

Міністерство освіти і науки України  
Національний університет «Києво-Могилянська академія»  
Факультет природничих наук  
Кафедра біології

## **Кваліфікаційна робота**

освітній ступінь – магістр

на тему: **«ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ХРОМОСОМНИХ  
АНОМАЛІЙ АБОРТНОГО МАТЕРІАЛУ»**

Виконала: студентка 2-го року навчання,  
Спеціальності  
091 Біологія

Гавриш Вікторія Вікторівна

Керівник: Білько Н.М.,  
доктор медичних наук, професор, зав.  
кафедри лабораторної діагностики  
біологічних систем НаУКМА  
Бадюк В.М.  
кандидат медичних наук., доцент  
НаУКМА

Рецензент: Ніколенко М.І.

Магістерська робота захищена  
з оцінкою " \_\_\_\_\_ "

Секретар ЕК Пахаренко М.В.  
«07» червня 2021 року

## ЗМІСТ

	Стор
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Проблема репродуктивних втрат .....	7
1.1.1 Геномні мутації .....	8
1.1.2 Хромосомні мутації.....	11
1.2 Стандартне каріотипування .....	13
1.3 Флуоресцентна <i>in situ</i> гібридизація (FISH).....	15
1.4 Метод порівняльної геномної гібридизації.....	188
1.4.1 Метафазна ПГГ.....	20
1.4.2 ПГГ з високою роздільною здатністю – HR-CGH.....	211
1.4.3 Мікроматрична ПГГ – aCGH.....	22
1.5 Секвенування.....	233
1.5.1 Метод Сенгера.....	24
1.5.2 Метод NGS .....	255
1.5.2.1. Історія виникнення NGS методу та його застосування в молекулярно-генетичних дослідженнях.....	27
1.5.2.2 Переваги та недоліки NGS.....	311
1.6 Світові тенденції генетичних досліджень абортного біоматеріалу матеріалу.....	322
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	355
2.1 Реактиви та матеріали .....	355
2.2 Об'єкт та методи дослідження.....	36
2.2.1 Методика проведення методу класичного каріотипування біоматеріалу.....	37
2.2.2 Метод FISH-аналізу.....	388
2.2.3 Методика аналізу методом NGS.....	4040
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	42
3.1 Каріотипування ворсин хоріона абортного матеріалу .....	42

3.2 Застосування FISH-аналіз для дослідження абортного біоматеріалу матерілу .....	455
3.3 NGS аналіз ворсин хоріона абортного матеріалу.....	47
ВИСНОВКИ .....	544
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	56
ДОДАТКИ .....	61

## УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ

NGS – next generation sequencing

FISH – Fluorescence In Situ Hybridization

pH – міра кислотності

ПЛР – полімерна-ланцюгова реакція

ДНК – Дезоксирибонуклеїнова кислота

CGH – Comparative Genomic Hybridization

aCGH – Array Comparative Genomic Hybridization

аб/м – абортний матеріал

## ВСТУП

**Актуальність дослідження:** Біля 10-20% всіх клінічно визнаних вагітностей закінчуються завмиранням плода, що відбувається на ранніх термінах. Близько 50% відбуваються через хромосомні аномалії плода, більшість з яких (86%) виникає через кількісні аберації, включаючи трисомії, моносомії і поліплодії. Структурні аномалії складають 6% таких втрат, а інші аномалії, такі як мутації одного гена та мозаїцизм, складають 8%. Генетичний аналіз ворсин хоріона абортного матеріалу дає цінну інформацію про причини викидня. Крім того, можуть бути визначені оцінки ризику рецидиву для наступних вагітностей.

**Мета:** Виконати та проаналізувати дані генетичних досліджень ворсин хоріона абортного матеріалу та визначити основні причини завмерлих вагітностей.

**Відповідно до мети були поставлені такі завдання:**

- Виконати та проаналізувати отримані дані ДНК-діагностики хромосомних аномалій методом NGS
- Провести класичне каріотипування абортного матеріалу
- Вивчити можливості та обмеження NGS
- Виконати каріотипування абортного матеріалу методом FISH

**Предметом дослідження** є генетичний статус плода при завмерлих вагітностей.

**Об'єкт дослідження:** скринінг ворсини хоріона завмерлих вагітностей.

**Методи дослідження:**

Задля виконання поставлених завдань були використані наступні методи дослідження:

- класичне каріотипування без культивування ворсин хоріона аб/м;
- метод флуоресцентної гібридизації *in situ*, або FISH-метод - цитогенетичний метод, який застосовують для детекції та визначення положення специфічної послідовності ДНК на метафазних хромосомах або в інтерфазних ядрах *in situ*;
- метод секвенування «нового» покоління (NGS);
- статистичні методи для обробки та порівняння результатів дослідження.

Робота виконана на основі бази клініко-діагностичної лабораторії МЦ ТОВ «Клініка генетики репродукції «Вікторія».

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Проблема репродуктивних втрат

Поняття «репродуктивні втрати» означає втрату продуктів зачаття на всіх етапах розвитку плода в результаті мимовільного або вимушеного (за медичними і соціальними показаннями) переривання вагітності, мертвонародження, а також смерть дітей першого року життя [1].

Основна частка у репродуктивних втратах доводиться на спонтанні аборти, які є досить гетерогенною групою щодо клінічних і морфологічних проявів. Залежно від тяжкості цих проявів всіх пренатально загиблих ембріонів чи плодів можна розділити на 3 групи: власне спонтанні аборти, завмерлі вагітності і анембріонія [1].

Етіологія спонтанних абортів різноманітна. Вони можуть бути викликані генетичними (генні, геномні та хромосомні мутації, імунологічна несумісність) і середовищні (захворювання матері, хімічні і фізичні дії) факторами. Причиною ранньої зупинки розвитку і внутрішньоутробної загибелі ембріона в першому триместрі вагітності в 50- 60% випадків є незбалансовані хромосомні аномалії [2, 51].

Від 10 до 15% усіх клінічно визнаних вагітностей призводить до самовільного аборту. Загальна поширеність втрат вагітності, включаючи біохімічну вагітність, як правило, вважається в 4–5 разів вищою [2].

Приблизно чверть усіх жінок зазнає принаймні одного викидня протягом життя. До 5% усіх пар стикаються з повторними викиднями [3].

Існує багато методів дослідження аб/м. Серед яких в тому числі виділяють стандартне каріотипування – стандартне цитогенетичне дослідження, секвенування ДНК, метод порівняльної геномної гібридизації. Зазвичай досліджують клітини ворсин хоріона. Хоріон - це ворсинчата

оболонка плідного яйця, яка у 16 тижнів вагітності трансформується в плаценту. Хромосомний набір хоріона відповідає каріотипу плода, тому генетичне дослідження ворсин хоріона може виявити хромосомні порушення, що стали причиною спонтанного абортів [4].

Проведення дослідження аб/м дає змогу оцінити причини переривання вагітності, та можливі шляхи уникнути спонтанних абортів в майбутньому [4].

### 1.1.1 Геномні мутації

Хромосомні хвороби посідають одне з провідних місць в структурі вродженої і спадкової патології людини. Головні ефекти хромосомних аномалій проявляються в трьох взаємопов'язаних клінічних варіантах: летальності або скорочення тривалості життя, вроджених вадах розвитку та розумової відсталості.

Летальний ефект є одним з головних факторів внутрішньоутробної гибелі, досить високою у людини. Так, за даними, представленим Gardner і Sutherland (2012), мутації є причиною ранніх доімплантаційних втрат (клінічно незареєстровані вагітності) ймовірно від чверті до половини всіх випадків. Частота хромосомних аномалій при спонтанних абортах становить приблизно 30%, і варіює в залежності від терміну вагітності. При терміні вагітності 8-11 тижнів вона становить 50% [5].

Група аномалій, що стосуються числових змін хромосом, включають анеуплоїдії і поліплоїдії. Вони практично завжди клінічно значущі і, як правило, формуються *de novo*, внаслідок геномних мутацій. Числові хромосомні аномалії є одними з найбільш частих генетичних порушень. В цілому 10% всіх сперматозоїдів і 25% всіх ооцитів є анеуплоїдними, що призводить до формування зигот з хромосомними аномаліями [6].

Середня частота числових хромосомних порушень у новонароджених складає 1:400. Приблизно 1/6 частина клінічно зареєстрованих вагітностей

переривається спонтанно. Близько 50% всіх самочинних абортів в першому триместрі вагітності викликані хромосомними порушеннями [7]. Ці цифри не включають велику кількість вагітностей, які залишаються незареєстрованими, тому що втрата ембріона відбувається на ранніх етапах, незабаром після запліднення.

Анеуплоїдія є найчастішою хромосомною патологією. Не менше 5% всіх клінічно реєстрованих вагітностей супроводжується трисомією або моносомією. Більшість анеуплоїдій є причиною порушення внутрішньоутробного розвитку і часто призводять до загибелі плода на ранніх етапах ембріогенезу. Однак деякі з них сумісні з живородінням (трисомії по аутосомам 13, 18, 21, статевими хромосомами і моносомія по хромосомі X) [6].

Анеуплоїдії виникають в результаті помилок сегрегації хромосом в мейозі або мітозі. До цих помилок відносяться нерозходження гомологічних хромосом в першому поділі або сестринських хроматид в другому поділі мейозу, передчасна сегрегація хроматид в першому мейозі і порушення кросинговеру. Доведено, що більше 90% випадків анеуплоїдій є наслідком мейотичного нерозходження хромосом у жінок. Ризик числових хромосомних порушень багато в чому залежить від віку матері [6].

Найбільш поширеною анеуплоїдією, що зустрічається при спонтанних абортах є трисомія по хромосомі 16. Частота цієї хромосомної аномалії складає 30% від діагностованих трисомій. Так, трисомія по хромосомі 15 зустрічається з частотою 7,5%, трисомія по хромосомі 21 - в 10,5% випадків з діагностованих трисомій. Трисомія по хромосомах 2, 18 зустрічаються з однаковою частотою (4%) і трисомія по хромосомі 22 - 11,4% [11].

Подвійні трисомії спостерігаються в абортному матеріалі набагато рідше. За літературними даними частота подвійних трисомій, діагностованих при завмерлих вагітностях, варіює від 0.21 до 2.8% [12]. Їх виникнення пов'язують з віком матері навіть частіше, ніж трисомії по 21 хромосомі.

Механізмом формування подвійних трисомій є одночасне нерозходження двох або трьох хромосом в період мітотичного поділу [12].

Не тільки окремі хромосоми, а й цілі хромосомні набори можуть відрізнятися від нормального числа. Поліплоїдії є причиною внутрішньоутробної загибелі ембріонів і плодів в 20-25% випадків, велика частка яких припадає на триплоїдії (17-18%) [8].

Поліплоїдії є випадковими подіями, що виникають унаслідок різних помилок в період запліднення. Тому, значного впливу на ризик розвитку інших хромосомних аномалій при наступних вагітностях не очікується або є вкрай низьким.

Триплоїдії і тетраплоїдії в основному спостерігаються в каріотипі плода при проведенні пренатальної цитогенетичної діагностики, так як ці мутації є летальними і вкрай рідко призводять до живородіння. Клінічні прояви залежать від батьківського походження додаткового набору хромосом [8].

У разі материнського походження додаткового хромосомного набору можна говорити про дігенічну (digynic) триплоїдію. Вона виникає в результаті запліднення ооцита з диплоїдним хромосомним набором гаплоїдним сперматозоїдом. Приблизно 70% триплоїдій мають батьківське походження і є діандричними (diandric).

Запліднення гаплоїдного ооцита за участю двох чоловічих пронуклеусів (подвійне запліднення) є найбільш поширеним механізмом формування триплоїдного хромосомного набору. До інших імовірних причин триплоїдії відносять запліднення ооцита диплоїдним сперматозоїдом, а також аномалії ендореplікацій хромосом при першому поділі зиготи [9].

Діандрична триплоїдія клінічно проявляється утворенням часткового міхурового занесення і супроводжується кістозним розростанням плаценти. При наявності двох гаплоїдних наборів батьківського походження і відсутності материнського набору хромосом утворюється повне міхурове занесення, що характеризується вираженим розростанням плаценти з

гіперпроліферативними змінами трофобласту, відсутністю сформованого плода і високим ризиком малігнізації з утворенням хоріонепітеліоми [9].

Передбачається також, що відмінності в фенотипі триплоїда материнського або батьківського походження пов'язані з ефектом геномного імпринтингу.

Тетраплоїдія - це летальна мутація. Відомо, що ряд клітин (гепатоцити, кардіоміоцити, клітини епітелію сечового міхура і трофобласта плаценти) можуть мати не тільки тетраплоїдний хромосомний набір, але і більш високі ступені поліплоїдизації. Тетраплоїдія при варіантах каріотипу 92, XXXX, 92, XXYY, і триплоїдія при варіантах каріотипу 69, XYY і 69, XXX є летальними мутаціями [10].

### 1.1.2 Хромосомні мутації

До групи хромосомних мутацій відносять такі порушення хромосом, при яких змінюється їх структура. Розрізняють внутрішньохромосомні і міжхромосомні перебудови.

До внутрішньохромосомних перебудов відносяться делеції, дуплікації, інверсії, кільцеві хромосоми і ізохромосоми. До міжхромосомних перебудов відносяться транслокації і інсерції. Всі види хромосомних аномалій можуть бути як успадкованими від батьків, так і виникати *de novo*. Структурні мутації зустрічаються рідше, ніж числові порушення [13].

Причиною виникнення структурних мутацій є розриви цукрово-фосфатних зв'язків в молекулі ДНК в результаті пошкодження однієї або декількох хромосом. Часто хромосомні розриви виникають спонтанно. Однак ушкодження хромосом можуть бути спровоковані певними факторами навколишнього середовища, такими як: іонізуюче випромінювання, вірусні інфекції та різні хімічні речовини [13].

Незважаючи на те, що переважна кількість структурних мутацій виникає спорадично, з'являючись в гаметах здорових батьків *de novo*, частина хромосомних мутацій відноситься до групи успадкованих. В такому випадку хромосомна перебудова вже є в статевих клітинах одного з батьків, що зумовлює порушення положень кросинговеру в мейозі I, призводить до формування незбалансованих гамет і часто є причиною безпліддя, спонтанних абортів і завмирання вагітностей [13].

Таким чином, якісна і повна діагностика аб/м, що включає тип мутації, залучену хромосому і розмір хромосомного дисбалансу, дозволяє коректно проводити медико-генетичне консультування. Всі ці дані допомагають визначити ризики повторного виникнення захворювання в сім'ї і оцінити перспективи застосування і ефективність методів пренатальної діагностики.

Клінічні прояви хромосомного дисбалансу в значній мірі залежать від розміру відповідної ділянки аберантної хромосоми і зміни числа копій певних районів хромосом [10]. Залежно від розташування і точок розривів втрачається різна кількість різних генів або порушується їх функціонування.

Більшість мікрodelецій і мікродуплікацій зустрічаються в хромосомах досить рідко. Ці аномалії представлені в основному дуже дрібними інтерстиціальними або термінальними делеціями. Більшість хромосомних мікроперебудов важко діагностуються. У деяких випадках поява мікрохромосомних перебудов може бути результатом прихованих незбалансованих транслокацій [14].

Найбільш поширеним механізмом формування мікрохромосомних перебудов є неалельна рекомбінація гомологічних хромосом. Обмін генетичним матеріалом між сестринськими хроматидами гомологічних хромосом (кросинговер) - нормальне явище, яке спостерігається в соматичних і статевих клітинах. Цей тип обміну забезпечує змішування пулів генів і є обов'язковими для нормального ділення клітин.

Обмін між неалельними районами хромосом може приводити до структурних хромосомних перебудов. Внаслідок того, що поломки хромосом теоретично можуть відбутися в будь-якому місці геному людини і залучена хромосома може рекомбінувати незліченну кількість разів, число потенційних перебудов може бути величезним.

На практиці, проте, перебудови зустрічаються в основному в певних ділянках геному, які найбільш сприйнятливі до розривів і пошкоджень, ніж інші. Структура геному людини організована таким чином, що сприйнятливість до пошкоджень спочатку існує в певних районах хромосом людини, так званих «гарячих точках» [14].

## **1.2 Стандартне каріотипування**

Метод каріотипування абортного матеріалу з'явився у 1960-х роках. Тоді користувалися довгочасним методом культивування усіх елементів плідного яйця. І лише у 1990-х роках почали застосовувати короткочасний метод аналізу ворсин хоріона [48].

Протягом десятиліть методика каріотипування набувала змін і вдосконалювалася, і на даний час вона дає можливість виявити ширший спектр хромосомних аномалій [49].

Стандартне каріотипування аб/м проводять наступним чином. Попередню оцінку матеріалу оцінюють за допомогою бінокулярної лупи. При відборі матеріалу в лабораторіях, видаляють згустки крові, ворсини відділяють від децидуальної оболонки, та промивають спеціальним розчином Хенкса, що сприяє зменшенню ймовірності контамінації материнських клітин.

Потім за допомогою лупи та стереомікроскопу проводять макроскопічну оцінку отриманих ворсин, описують їх зовнішній вигляд: довжину, розгалуженість, васкуляризацію; а також наявність

патоморфологічних змін: набряклість, гідатидні вирости (кількість, форми, розміри, вміст), автоліз, та мацерація [54].

Найбільш придатними для каріотипування вважаються короткі і довгі розгалужені васкуляризовані ворсини (з кровоносними судинами), широко покриті клітинами синцитіотрофобласта – зовнішнього шару трофобласта. Придатними для дослідження враховують також набряклі та склерозовані ворсини, мацеровані, та котрі частково піддалися автолізу.

Непридатними для досліджень вважають зразки, що постачаються у розчині формаліну, спирту, заморожені або сильно пошкоджені ворсини, зразки без клітин синцитіотрофобласта, децидуальна та сполучна тканина [54].

Для аналізу ворсин хоріона завмерлої вагітності у зразку мають міститися живі клітини, тобто клітини, що здатні до мітотичного поділу, тому від давності завмирання ембріону залежить успіх аналізу. Зазвичай за допомогою стандартного каріотипування можна визначити каріотипи завмерлої вагітності в середньому у 70% випадків [24].

Згідно з методикою, близько 30 мг ворсин на 3 мл розчину Хенкса з колхіцином і етидієм бромистим витримують в термостаті протягом 40 хвилин при температурі 37 °С. При цій же температурі протягом 40 хвилин проводять гіпотонізацію в розчині дигідрату цитрату натрію (1%), а потім фіксацію матеріалу розчином метанолу і крижаною оцтовою кислотою.

Для проведення дослідження використовують клітини, що знаходяться у метафазі мітозу. Колхіцин додають для того, щоб припинити утворення мікротрубочок перешкоджаючи розходженню хроматид і завершенню мітоза.

Мацерація ворсин трофобласта відбувається після додавання 60% розчину крижаної оцтової кислоти з подальшим нанесенням суспензії на предметні скельця, які забарвляють методом GTG (диференціального фарбування хромосом з використанням трипсину). Хромосомні препарати за допомогою мікроскопів зі спеціальними цифровими камерами фотографують.

Отримані фотографії аналізуються за допомогою спеціальних комп'ютерних програм [54].

Варто сказати, що метод стандартного каріотипування має деякі недоліки. Діагностичні можливості рутинного каріотипування сильно обмежені. Даний метод не виявляє мікрохромосомні перебудови (делеції, дуплікації, інверсії), оскільки фотографії мають занадто низьку роздільну здатність. Аналіз неможливо провести без наявності клітин, що діляться, а якість аналізу залежить від досвіду дослідника та якості матеріалу [15].

Метод також має переваги. Він аналізує структуру і кількість хромосом, виявляє транслокації, маркерні хромосоми та мозаїцизм [15]. А враховуючи високу вартість більш точних досліджень, стандартне каріотипування залишається найбільш доступним, рутинним та досить інформативним методом. Однак новітні методи можуть застосовуватися як допоміжні засоби для оптимізації результатів стандартного каріотипування [15, 54].

### **1.3 Флуоресцентна *in situ* гібридизація (FISH)**

Всі сучасні методи молекулярної цитогенетики ґрунтуються на принципі гібридизації нуклеїнових кислот *in situ* (Fluorescence In Situ Hybridization - FISH). Реакція гібридизації відбувається при комплементарному зв'язуванні ДНК-послідовностей зонду з ДНК-послідовностями мішені в метафазних хромосомах або інтерфазних клітинах і включає три основних етапи:

- 1) денатурація дволанцюгових ДНК зонда і ДНК мішені до одноланцюгових під впливом високої температури або хімічних агентів;
- 2) гібридизація ДНК зонда з ДНК мішені за принципом комплементарності з утворенням дволанцюгової гібридної молекули;

3) постгібридне відмивання і контрольне фарбування клітинної ДНК комплементарним барвником (зазвичай DAPI або йодистим пропідієм) [27, 28].

У клінічній цитогенетиці найчастіше використовуються ДНК-зонди, створені в результаті мічення різних фрагментів ДНК. Флуоресцентне мічення сателітної ДНК використовують для отримання центромероспецифічних ДНК-зондів, які, як правило, застосовують для виявлення числових хромосомних аномалій [28].

Високо повторювані послідовності такої ДНК дають яскравий і чіткий гібридизаційний сигнал, що дозволяє проводити аналіз кількості флуоресцентних сигналів не тільки в метафазних пластинках, а й в інтерфазних ядрах. Крім того, FISH-аналіз інтерфазних ядер з сателітними ДНК-зондами представляється доцільним для виявлення низкорівневого і прихованого мозаїцизму [28].

Клоновані унікальні послідовності ДНК окремих хромосомних районів використовують для отримання локус-специфічних ДНК-зондів, які застосовуються для діагностики синдромів, пов'язаних з мікрделеціями і мікродуплікаціями, а також з метою картування генів. Картування – це процедура, яка дозволяє виявити місце розташування генів у хромосомах [29].

Серед цього типу зондів слід окремо виділити теломерні і субтеломерні ДНК-зонди, які отримуються при міченні послідовностей ДНК, комплементарних повторюваним теломерним і унікальним субтеломерним послідовностям. Вони особливо актуальні в діагностиці хромосомного дисбалансу, пов'язаного з ідіопатичною розумовою відсталістю і МВВР (множинні вроджені вади розвитку) [29].

Цільнохромосомні ДНК-зонди, що забарвлюють хромосому по всій довжині використовують для ідентифікації цілих хромосом і їх фрагментів, для діагностики складних транслокацій, інсерцій і т.д. [29].

Завдяки стрімкому розвитку комп'ютерних технологій в області медицини, з'явилася можливість цифрового запису мікроскопічних зображень і їх комп'ютерної обробки. Таким чином, були створені принципово нові підходи до візуалізації та ідентифікації хромосомного матеріалу [30].

Паралельний розвиток методів *in situ* гібридизації, створення різноманітних ДНК-зондів з одного боку і вдосконалення флуоресцентної мікроскопії, розробка нових способів комп'ютерного аналізу (цифрового запису і комп'ютерної обробки) мікрозображень з іншого - призвели до появи нових технологій FISH [30].

В основі FISH лежить комбінаторне мічення, при якому ДНК-зонд мітиться не одним флуорохромом, а їх комбінацією і подальша реєстрація інтенсивності світіння кожного окремого флуорохрома для всіх точок зображення дозволяє перевести різні комбінації флуорохромів у псевдокольори, індивідуальних для кожної хромосоми [30].

У 1996 р на основі цього принципу з'явилися дві повноколірні технології - mFISH (multicolour FISH) і SKY (Spectral Karyotyping). Для аналізу mFISH використовують флуоресцентні світлофільтри зі спектральними характеристиками, що відповідають певним флуорохромам. Обробка отриманих цифрових зображень відбувається за допомогою спеціального програмного забезпечення, яке переводить інформацію про інтенсивність сигналів флуорохромів в кожній точці зображення у псевдокольори.

Альтернативним рішенням є техніка SKY, при якій захоплення зображення здійснюється за допомогою інтерферометра, що дозволяє зареєструвати інтенсивність флуоресцентних сигналів одночасно для кожної точки зображення. На відміну від mFISH, спектральне каріотипування дозволяє використовувати флуорохроми зі спектрами флуоресценції, що перекриваються [29].

Повноколірна FISH не дозволяє ідентифікувати внутрішньохромосомні перебудови, тому розвиток даної технології було направлено на розробку «кольорових» ДНК-зондів, специфічних до сегментів хромосом.

У 1999 році був розроблений комплект мікродиссекційних ДНК-зондів - mBAND (Multi Colour Banding), який дозволяє проводити детальне дослідження окремої хромосоми [30].

В основі методу також лежить принцип комбінаторного мічення, однак при цифровій реєстрації та комп'ютерній обробці зображення відбувається не тільки переклад комбінації флуорохромів в псевдокольори, а й оцінюється співвідношення інтенсивності флуоресценції кожного барвника [30].

Отже, метод флуоресцентної *in situ* гібридизації добре виявляє анеуплоїдії, мозаїцизм, ідентифікує множинні маркерні хромосоми, виявляє числові і структурні хромосомні аберації, багато мікрохромосомних аномалій і комплексних перебудов генома [27, 28, 29].

Перевагами флуоресцентної гібридизації є швидкість отримання результатів, і можливість застосування після медикаментозного аборту [53, 54].

Однак повноколірний метод FiSH не знайшов широкого практичного застосування, і в більшості лабораторій для цих досліджень використовується обмежена кількість зондів, що не дозволяє виявити рідкісні аутосомні трисомії, а також структурні мутації хромосом, і, в основному, дозволяє оцінити тільки кількість копій певних хромосом або їх районів. [53, 54].

Повну інформацію про геномний дисбаланс можна отримати, використовуючи метод порівняльної геномної гібридизації.

#### **1.4 Метод порівняльної геномної гібридизації**

Порівняльна геномна гібридизація (CGH - Comparative Genomic Hybridization) відноситься до високотехнологічного молекулярно-

цитогенетичного методу аналізу, що дозволяє провести скринінг всього геному в одній реакції.

Метод порівняльної геномної гібридизації був вперше описаний у 1992 році [17]. Спочатку цей метод використовували в онкології для визначення аберацій в ракових клітинах солідних пухлин, оскільки застосування звичайного цитогенетичного дослідження в таких тканинах дуже ускладнено [17].

Пізніше, у 1995 цю техніку почали застосовувати у цитогенетиці та у 2000 у пренатальній діагностиці [18].

Використання методу молекулярного каріотипування є актуальним не лише у діагностиці мікрохромосомних перебудов, але і в таких випадках, коли методом стандартного каріотипування неможливо ідентифікувати хромосомну перебудову [16].

Крім можливості аналізу геному в одній реакції гібридизації, метод має ряд переваг. Для проведення аналізу не потрібна наявність живих клітин, а відсутність необхідності у підготовці хромосомних препаратів дає можливість проводити аналіз на будь-якому матеріалі, з якого можна отримати ДНК. Це особливо актуально у випадках завмерлої вагітності [16, 17]. Відсутність хромосомних препаратів дозволяє уникнути появи артефактів, пов'язаних з процесом культивування клітин [19].

Крім переваг, метод CGH має свої недоліки. Технологія виявляє геномні дисбаланси – делеції та дуплікації, але не дає інформацію про їх походження. Всі структурні перебудови, що не змінюють кількість хромосомного матеріалу в геномі, не діагностуються: транслокації, інверсії, інсерції. Порівняльна геномна гібридизація не виявляє поліплоїдії, оскільки при проведенні аналізу використовують еквімолярні кількості ДНК [19, 20].

### 1.4.1 Метафазна ПГГ

Метод CGH дозволяє виявляти хромосомні райони, в яких присутній чисельний геномний дисбаланс у вигляді дуплікації або делеції, порівнюючи результати гібридизації двох зразків ДНК: отриманої від аб/м (дослідна ДНК) і від організму з нормальним каріотипом (референсна ДНК).

Дослідна і референсна ДНК фарбуються флуорохромами, що мають світіння різного кольору. Фарбування може бути непрямим, коли в якості мітки використовують модифіковані дезоксинуклеотиди, пов'язані з біотином або дигоксигеніном [17, 21]. Або прямим, при використанні флуорохром-кон'югативних дезоксинуклеотидів [21].

Гібридизація здійснюється на хромосомному препараті, в присутності Cot-1 ДНК для супресії диспергованих послідовностей ДНК, що повторюються, в геномі [22].

Аналіз проводиться при використанні спеціальної комп'ютерної програми обробки цифрового зображення, яка оцінює співвідношення інтенсивності флуоресцентних сигналів двох різних кольорів, якими мітили дослідну та референсну ДНК, по середній осі хромосоми, що графічно відображається у вигляді профілю гібридизації для кожної пари хромосом [18, 22].

Якщо в дослідній ДНК немає чисельного дисбалансу, то співвідношення інтенсивності флуоресцентних сигналів уздовж всієї хромосоми має дорівнювати 1,0 [21]. За відхиленнями профілю гібридизації від цього значення визначають делецію хромосомного матеріалу, коли це співвідношення менше 0,5 або дуплікацію, коли це співвідношення більше 1,5.

При наявності в дослідному зразку 50% мозаїчного клону, профіль буде відхилятися відповідно, але при моносомії співвідношення інтенсивності флуоресцентних сигналів дорівнюватиме 0,75, а при трисомії 1,25 [21].

Необхідність використання для аналізу результатів CGH програмного забезпечення призвела до активного розвитку на світовому ринку

комп'ютерних програм. В даний час існує ряд фірм-виробників, які розробили спеціалізовані комп'ютерні програми для обробки та аналізу результатів порівняльної геномної гібридизації.

Ці програми для обробки цифрового зображення постійно оптимізуються і вдосконалюються для уніфікації аналізу CGH. Роздільна здатність метафазної CGH досить низька, що не дозволяє використовувати її для виявлення хромосомних перебудов меншого розміру [16]. Саме тому перспективним напрямком в галузі молекулярної цитогенетики став розвиток і вдосконалення методу CGH, пов'язаний зі збільшенням роздільної здатності методу.

#### **1.4.2 ПГГ з високою роздільною здатністю – HR-CGH**

HR-CGH (High-Resolution Comparative Genomic Hybridization) – методика, розроблена у 1997 році датськими вченими, що дозволила підвищити роздільну здатність (чутливість) і специфічність методу метафазної порівняльної гібридизації [23].

Для оцінки відхилення профілю гібридизації автори використовували в якості порогових значень не фіксовані інтервали, спочатку представлені в програмі, а розробили власні динамічні стандартні референсні інтервали, індивідуальні для кожної хромосоми [23].

Ці інтервали побудовані при аналізі результатів гібридизації з використанням мічених зразків ДНК, отриманих від різних індивідів з нормальним каріотипом (гібридизація «норма на норму»).

Основною передумовою для створення власних стандартних референсних інтервалів було те, що профілі гібридизації, отримані при аналізі гібридизації нормальних ДНК від різних індивідів часто показували систематичні відхилення від 1,0. Також відзначено, що ці систематичні відхилення, які від препарату до препарату представлені в різному ступені, але

в одних і тих самих районах хромосом, залежать від умов гібридизації і використовуюваного в лабораторії протоколу дослідження [14].

Отже, ці інтервали повинні бути побудовані винятково в тій лабораторії, в якій вони будуть використовуватися. Таким чином, на базі середніх статистичних профілей гібридизації формується модель для діагностики хромосомного дисбалансу, де аналізований профіль (або його довірчий інтервал) порівнюється з контрольним. Район, де ці інтервали не перекриваються вважається аберрантним [14].

Сучасне програмне забезпечення для обробки цифрового зображення передбачає опцію порівняльної геномної гібридизації високого дозволу - HR-CGH, але для активації даної опції необхідно отримати базу даних контрольних профілей гібридизації.

Обов'язковою умовою підвищення роздільної здатності методу є формування власних контрольних ПГ. На основі цієї бази автоматично формуються стандартні референсні інтервали, необхідні для аналізу з високою роздільною здатністю [14, 23].

### **1.4.3 Мікроматрична ПГГ – Aсgh**

Технологія порівняльної геномної гібридизації активно розвивалася і в 1997 році вперше застосували в якості платформи для гібридизації предметне скло, на якому були розташовані мічені ДНК фрагменти [25]. Заміна метафазних хромосом в препараті на велику кількість клонів, нанесених на скло-мікроматрицю, значно підвищила роздільну здатність методу для скринінгу геномного дисбалансу.

Мікроматрична порівняльна геномна гібридизація (Array Comparative Genomic Hybridization CGH - aCGH), як і метафазна CGH, дозволяє проводити повногеномну діагностику наявності хромосомних аномалій без необхідності

культивування матеріалу і приготування з нього цитогенетичних препаратів [25].

Роздільна здатність методу залежить від дизайну біочіпа, а саме від розміру клонів і щільності фрагментів ДНК на мікроматриці. Окрім повногеномних CGH-чипів (whole genome array), використовуються клони, представлені ДНК-послідовностями, рівномірно розподілених по всьому геному. Існують, також, і таргетні матриці (targeted array), сконструйовані з використанням клонів, що відповідають специфічним районам, найбільш часто залучених в хромосомні перебудови [25, 26].

Проте, при використанні цього методу існують певні складності, пов'язані саме з його високою роздільною здатністю. Інтерпретація результатів array-CGH досить проблематична в зв'язку з явищем поліморфізму за кількістю копій великих блоків хромосом (CNVs - Copy Number Variations). Будь-які два індивідуальних генома відрізняються більш ніж на тисячу CNVs.

Однак, розташування, розмір, розподіл в популяції і функції деяких CNVs все ще залишаються невідомими. Отже, немає і чіткого уявлення, які варіанти можна вважати поліморфними, непатогенними, які не супроводжуються аномаліями фенотипу, а які - клінічно значущими і ведуть до формування захворювання [25].

Мікроматрична ПГГ є корисним методом для виявлення хромосомних аномалій при викиднях та завмерлій вагітності, оскільки має більш високу роздільну здатність, значно вищий рівень виявлення мутацій, не залежить від проблем невдач культури, забруднення материнськими клітинами та поганої морфології хромосом.

## **1.5 Секвенування.**

Секвенування (від англ. Sequence - «послідовність») - це загальна назва методів, які дозволяють встановити точну послідовність нуклеотидів А, Т, G і С в полінуклеотиді, який кодує різноманітні білки.

Технології методу хімічної деградації, запропоновані Максамом і Гілбертом, метод дезокси-термінації ланцюга, розроблені компанією Sanger в 1997 році і автоматичне секвенування з поміченою флуоресценцією в 1990-х роках разом сформували перше покоління секвенування (FGS – first generation sequencing). Завдяки своїй простоті метод Сенгера став домінуючим серед FGS [31].

Після 13 років досліджень у багатьох лабораторіях світу, у 2003 році міжнародний проект консорціума «Геном людини» (HGP) вперше секвенував і картував весь геном людини [31].

### 1.5.1 Метод Сенгера

Фредерік Сенгер разом зі своїми колегами почали свої дослідження з розробки технології секвенування з інсуліну, потім РНК, а потім ДНК. Його дослідження проклали шлях до метода секвенування, або переривання ланцюга Сенгера, в 1995 році.

Даний метод є одним із перших методів секвенування ДНК, він домінує в геноміці вже декілька десятків років. Метод Сенгера проклав шлях до сучасних технологій секвенування [31].

У класичному варіанті методу Сенгера один з ланцюгів аналізованої ДНК виступає в якості матриці для синтезу комплементарного ланцюга ферментом ДНК-полімеразою.

Хімічна реакція проводиться у чотирьох різних реакційних пробірках, кожна з яких містить матричну ДНК, праймери, ДНК-полімеразу і чотири dNTP, один з яких радіоактивно помічений [31].

Зразок ДНК ділиться на чотири різні реакції секвенування, що містять всі чотири стандартні дезоксинуклеотиди (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) і ДНК-полімеразу. До кожної реакції додається лише один із чотирьох дидезоксинуклеотидів (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP), в той час як інше

додані нуклеотиди звичайні. Після денатурації і відпалу праймера фермент ДНК-полімераза починає додавати dNTP у наново синтезований ланцюг ДНК, і якщо ddNTP включається, реакція завершується. Це призводить до роздільного збору ланцюгів ДНК різних розмірів у всіх чотирьох реакційних пробірках. Результат окремої реакції потім поміщають в окремі лунки поліакриламідного гелю. Радіоактивна пляма вказує на фрагменти ДНК з ddNTP, що знаходяться в певному положенні [31].

Нуклеотидна послідовність в гелі, визначається знизу догори. А нуклеотидна послідовність в різних смугах термінатора дає шаблон нуклеотидної послідовності [31].

Метод Сенгера – кращий метод для виявлення коротких тандемних повторів і секвенування окремих генів. Однак найбільшим недоліком цього методу, є кількість часу, який він потребує, що пов'язано з низькою пропускнуою спроможністю. Метод може обробляти лише відносно короткі послідовності ДНК (до 300-1000 пар основ) одночасно [31].

### 1.5.2 Метод NGS

Секвенування другого покоління (SGS - second generation sequencing) або секвенування наступного покоління (NGS – next generation sequencing) відноситься до високопродуктивних технологій секвенування ДНК, які можуть секвенувати мільйони і мільярди ланцюгів ДНК. При цьому процес визначення послідовності відбувається з використанням ферментативної реплікації або ампліфікації, яка забезпечує значну пропускну здатність і множинне секвенування цільових областей [31].

Тільки 1% послідовностей ДНК людини кодує білки і носить назву «екзом». Екзом організований в приблизно 22 тис. генів і, як прийнято вважати, містить 85% відомих або потенційних генетичних варіантів, що викликають небезпечні мутації. Тому секвенування генома є секвенуванням

всього генетичного коду, а секвенування екзома відноситься тільки до частин генома, які містять білок-кодуючі гени. Обидва методи вважаються повногемними [44].

Існує цілий ряд технологічних платформ для проведення NGS, які розрізняються способом проведення секвенування. Основні етапи в цілому схожі, а саме:

- 1) Отримання множини коротких фрагментів ДНК, або молекул матричної РНК;
- 2) Ампліфікація цих коротких послідовностей за допомогою великої кількості специфічних ДНК – зондів із застосуванням мультиплексної ПЛР;
- 3) Отримання бібліотеки генів (тобто набору ферментів ДНК із даного зразку) для наступного секвенування.
- 4) Високотехнологічне зчитування нуклеотидних послідовностей в цій множині генних фрагментів;
- 5) Здійснення комп'ютерної обробки отриманих масивів даних і порівняння з референсними зразками послідовностей генів [31, 32].

Це дозволяє встановити наявність сотень і тисяч генних мутацій за відносно короткий проміжок часу (від декількох годин до декількох діб) [32].

Зчитування сиквенсів, тобто визначення послідовності нуклеотидів в коротких фрагментах ДНК, може проводитись різними способами: за допомогою піросеквенування (зараз застосовується рідко), гібридизація на мікрочастках, мікро-рН-метрія, мас-спектрометрія і т.д. [31, 32, 33].

### **1.5.2.1. Історія виникнення NGS методу та його застосування в молекулярно-генетичних дослідженнях**

Впровадження Максамом і Гілбертом метода термінації хімічних ланцюгів для секвенування ДНК в 1977 році, за яким в тому ж році з'явився метод Сенгера викликав революцію в біології. Ці методи привели до секвенування більших геномів, кульмінацією якого став проект «Геном людини» [31].

В якості наступного кроку були вжиті великомасштабні проекти секвенування для вивчення варіацій послідовності людини. Однак для проектів такого типу секвенування по методу Сенгера було занадто складним, тривалим і дорогим [31].

У 2004 році національний дослідницький інститут геному людини ініціював програму зниження вартості секвенування всього генома до 1000 доларів за 10 років. Це прискорило розробку більш дешевих і швидких методів – технологій NGS, - генеруючих від тисяч до мільйонів реакцій секвенування за цикл [31].

Зараз технології секвенування, що застосовуються, формально ділять на NGS другого та третього покоління. До другого відносять секвенатори, що дозволяють отримати велику кількість коротких зчитувань (25-800 пар основ), зокрема: 454 Life Sciences, Illumina, Ion Torrent [31].

І хоча методи другого покоління призвели до революції в біології, через ряд їх недоліків, знадобилась необхідність в розробці методів, що спроможні краще справлятися з розшифровкою геному.

В сучасних молекулярно-генетичних дослідженнях використовується багато технологій. Основні з них – секвенування шляхом синтезу (SBS), секвенування шляхом лігування (ABI/SOLiD), іонно-напівпровідникове (Ion Torrent), одномолекулярне (SMRT) та нанопорове секвенування (ONT) [31].

Платформа секвенування за допомогою синтезу (SBS) заснована на методі реверсивної термінації, і складається з чотирьох основних етапів: підготовка зразку, генерація кластерів, секвенування і аналіз даних [34, 35].

ДНК ланцюг випадково фрагментується (200-600 пар основ) ферментом транспозазою. Далі відбувається лігування адаптерів. В якості альтернативи додаються індекси з 6 пар основ, які створюють унікальний штрих-код для зразку. Фрагменти, ліговані адаптером, ампліфікують за допомогою реакції ПЛР, а потім очищають [34, 35].

Зразок завантажують в проточний осередок з газом з двох типів олігозидів, які доповнюють послідовність адаптера фрагментів ДНК. Кожний гібридизований фрагмент ДНК приєднується до компліментарного олігозида, і фермент ДНК-полімераза створює компліментарний ланцюг. Дволанцюгова ДНК денатурується, а вихідний шаблон вимивається, в той час як новий фрагмент, який ковалентно зв'язаний з проточним осередком, залишається [34, 35].

Одноланцюгова ДНК утворює мостик шляхом гібридизації із сусіднім комплементарним праймером, подовжується за допомогою полімерази, що призводить до утворення дволанцюгового ДНК-містка, який згодом денатурується і утворюється дві одноланцюгових ДНК, ковалентно приєднані до проточного осередку.

Цикл ампліфікації повторюється багато разів. Аналогічно, кожний фермент ампліфікується в окремі клональні кластери, за допомогою місткової ампліфікації, залишаючи кластер з одноманітною послідовністю ДНК [34, 35].

Після клональної ампліфікації зворотня одноланцюгова ДНК відщеплюється і вимивається, залишаючи лише пряму ДНК, приєднану до проточної клітини. Праймер відпалює передню нитку і починає додавати флуоресцентно помічені ddNTP. Тільки одна базова пара додається за допомогою зворотнього термінатора. Коли основа включена і флуорофор збуджується лазером, випромінювання реєструється. Флуорофор відщеплюється, термінатор видаляється, а цикл повторюється до того часу, коли пряма нитка не буде повністю секвенована, що і дає послідовне секвенування [34, 35].

Платформа секвенування за допомогою синтезу забезпечує визначення нуклеотидних послідовностей довжиною в середньому 50-300 нуклеотидів, що набагато менше, ніж і методі Сенгера, в результаті чого складається великий масив даних і виникає необхідність в автоматизації процесу обробки за допомогою високопродуктивної техніки. Процес обробки даних включає наступні основні кроки: фільтрація послідовності і корекція помилок, вирівнювання і об'єднання, аналіз результатів [31].

Технологія іонно-напівпровідникового секвенування відрізняється від інших технологій секвенування тим, що не використовує модифіковані нуклеотиди і оптичні датчики. Це швидкі, компактні і економічні секвенатори [37, 38].

Світло в технології Ion Torrent працює як посередник. В цьому методі використовується напівпровідникова система виявлення при секвенуванні послідовності, заснована на виявленні іонів гідрогену, який є продуктом додавання нуклеотидів до шаблонного ланцюга під час полімеризації [37]. Бусини, що містять збагачену ДНК додаються до мікроосередку на чипі. Мікролунки, що містять необхідну для секвенування молекулу матричної ДНК, наповнюють dNTP одного виду. Якщо введений dNTP є комплементарним до ведучого нуклеотиду шаблону, він включається до комплементарного ланцюга, яка зростає [37, 38].

Це викликає вивільнення іонів гідрогену, яке ініціює спрацьовування іонного датчика, яке вказує на те, що реакція пройшла. Якщо в послідовності матричного ланцюга існує повтор одного нуклеотиду, декілька молекул dNTP будуть приєднані в одному циклі. Це призводить до збільшення кількості утворених іонів гідрогену і пропорційно більш високому електричному сигналу [37, 38].

Проведення попередньої ПЛР необхідно для збільшення сигналу про зміну в значенні рН. Це значення рН в кожній окремій лунці на чипі дає близько мільйона копій одного з вихідних ДНК фрагментів, прикріплених до поверхні

мікросфери. Для цього підготовлену таким чином бібліотеку ДНК денатурують і розподіляють на мікроелектронний чип, маючий мільйони мікролунок з іон-чутливою поверхнею, пов'язаною з датчиками. Потім послідовно додіють реакційні ПЛР-суміші, що відрізняються за складом наявністю в них лише одного з чотирьох нуклеотидів, і визначають рН в лунках, де відбулося вбудовування цих нуклеотидів в комплементарні ланцюги ДНК [37, 38].

Технологія одномолекулярного секвенування в реальному часі (Single-molecule real-time sequencing – SMRT) заснована на спостереженні в реальному часі за синтезом ДНК-полімеразою нового ланцюга на ДНК-матриці [41, 42].

Технологія SMRT засновується на двох ключових нововведеннях: хвильоводах з нульовою модою (zero-mode waveguides / ZMW) і флуорофорах, пришитих до до термінальної фосфатної групи нуклеотидів. Хвильоводи ZMW підводять світло виключно до нижньої частини осередку, в якій іммобілізований комплекс (ДНК-полімераза – матриця для синтезу) [42]. Нуклеотиди з флуоресцентними мітками дозволяють спостерігати за іммобілізованим комплексом, оскільки ДНК-полімераза синтезує ланцюг ДНК.

Принцип, що лежить в основі Pacific biosystems SMRT вельми відрізняється від інших методів секвенування. Він використовує одну молекулу для виявлення, тому для підготовки бібліотеки ампліконів не потребується ніякого етапу ампліфікації [41, 42].

Флуоресцентно помічені нуклеотиди додаються в лунку, і флуоресцентна мітка від'єднується від нуклеотиду, як тільки він вмикається в одноланцюгову ДНК, котра пов'язана з іммобілізованою ДНК-полімеразою. Флуорофор, що вивільнився, деактивується.

Секвенування матриці проходить шляхом моніторингу в режимі реального часу обробки дезоксинуклеотидтрифосфатів ДНК-полімеразою,

поміченою флуорофорами через кінцеву фосфатну групу, коли нуклеотиди вмикаються в ланцюг ДНК, що росте [41, 42].

Технологія секвенування нанопор була досліджена ще до того, як були розвинені технології NGS секвенування. Принцип роботи секвенсорів ONT заснований на вимірюванні електричного току при проходженні молекули нуклеїнової кислоти через нанопору [43].

Детектування здійснюється в камері з роздільною мембраною, що містить нанопору. В камері прикладається напруга, що змушує ДНК або РНК рухатись через пору. По мірі проходження молекули, перетин пори зменшується, в результаті чого зменшується сила струму. Таким чином, вимірюючи струм, можна визначити тип нуклеотиду, що проходить через пору в заданий інтервал часу [43].

### **1.5.2.2 Переваги та недоліки NGS**

Основні переваги технологій NGS полягають в тому, що вони не потребують бактеріального клонування фрагментів ДНК і електрофоретичного поділу продуктів секвенування. Методи NGS мають велику продуктивність, дозволяють виконувати одночасне зчитування мільярдів коротких фрагментів нуклеїнових кислот. Крім того, NGS дає можливість проводити секвенування відразу декількох десятків геномів за один запуск аналізатора [29].

Метод NGS має також багато недоліків. Одним із них є створення необхідної інфраструктури, такої як комп'ютерна ємність і зберігання, а також кадровий досвід, необхідний для всебічного аналізу та інтерпретації даних. Фактична собівартість NGS незначна. Однак, щоб зробити NGS економічно ефективним, довелося б запускати аналіз великої кількості зразків, які можуть вимагати складної централізації [29].

Метод не може бути використаний в якості єдиного для виявлення всіх хромосомних мутацій аб/м. Так, за допомогою високопродуктивного секвенування не можуть бути виявлені великі інсерції і делеції, хромосомні перебудови, поліплоїдії; не можуть бути оцінені рівні метилування, варіацій числа повторів (в тому числі триплетів). Існують обмеження по виявленню мутацій в областях генома, які важко піддати секвенування (GC-багаті ділянки), є складнощі по детекції мутацій в генах, для яких існує псевдоген і мутацій в стані мозаїцизму [44].

Крім того, недостатньо відомостей про те, як інтерпретувати мутації в інтронних областях (за винятком канонічних сайтів сплайсингу). Таким чином, хоча технічно проведення аналізу всього генома стало в даний час доступним, є складнощі в інтерпретації отриманих результатів.

В якості недоліків Ion Torrent можна відмітити значну кількість похибок секвенування у вигляді однонуклеотидних вставок і делецій. Другим недоліком цієї системи і коротка довжина зчитування, порівняно з іншими методами NGS [31, 37, 38].

## **1.6 Світові тенденції генетичних досліджень абортного біоматеріалу матеріалу**

«Золотим стандартом» діагностик и хромосомних аномалій вважається стандартне цитогенетичне дослідження каріотипу. Цей метод дозволяє ідентифікувати більшість хромосомних перебудов геному і найбільш часто використовується в цитогенетичних лабораторіях.

Тим часом, великий спектр числових і структурних аномалій хромосом, що ведуть до репродуктивної втрати, вимагають застосування різноманітних методів їх детекції. В останні десятиліття цитогенетика людини активно розвивалася, що привело до появи нових діагностичних підходів щодо виявлення геномного дисбалансу. Крім стандартного цитогенетичного

методу, де об'єктом дослідження служать метафазні хромосоми, в даний час активно використовують молекулярно-цитогенетичні технології, які не вимагають приготування хромосомних препаратів, а об'єктом дослідження є хроматин інтерфазних ядер або навіть геномна ДНК, що дозволяє проводити дослідження генома на будь-яких тканинах і будь-якому матеріалі, в тому числі і архівному.

В даний час з'явилася можливість використовувати сучасні методи визначення хромосомного набору з вищою роздільною здатністю, такі як порівняльна геномна гібридизація, мікроматрична порівняльна геномна гібридизація і секвенування нового покоління, які, за попередніми оцінками, можуть додатково виявляти від 3,8 до 13% аномалій [50].

Метод CGH, особливо aCGH (Array Comparative Genomic Hybridization – мікроматрична порівняльна геномна гібридизація) широко застосовується в діагностиці геномного дисбалансу в багатьох країнах Європи і Америки. На жаль, в Україні цей метод практично не використовується. Проте, метод метафазної CGH в силу своїх діагностичних можливостей і економічної доцільності, міг би знайти широке застосування в повсякденній цитогенетичній практиці.

По мірі розвитку NGS-технологій і конкуренції між різними методичними підходами, вартість NGS на 1 досліджуваний зразок знижується. Так в даний час силами однієї лабораторії можна секвенувати весь геном аб/м за досить низьку вартість (близько 1000 доларів), що зробило цю процедуру доступною для багатьох західних і американських лабораторій та університетів [31].

Секвенатори Illumina наразі найбільш популярні. Вони мають високу точність секвенування, продуктивність, відношення ціна / якість, а також можливість отримання парних зчитувань з двох кінців фрагменту довжиною до 750 пар основ. Це дозволяє збільшити точність вирівнювання фрагментів на референсний геном [31].

Серед всієї кількості методів поки не існує єдиного універсального. Тому в кожному конкретному випадку необхідний вибір методу, що підходить більше за інших.

Проте, тільки комплексний підхід з використанням додаткових цитогенетичних, молекулярно-цитогенетичних і молекулярних методів дослідження дозволяє повністю ідентифікувати структуру усіх хромосомних аномалій і зробити висновки щодо можливості повторного спонтанного абортів чи завмирання вагітності.

## РОЗДІЛ 2.

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

#### 2.1 Реактиви та матеріали

У ході дослідження використовували таке лабораторне обладнання та матеріали:

- електронні ваги ТВЕ-3;
- термостат сухоповітряний ТС-20 Мізма;
- гібридизатор ThermoBrite;
- предметні скельця Deltalab;
- шприц 20 мл;
- лабораторний стакан 250 мл;
- пастерівські піпетки;
- витяжна шафа ШВЛ-05 «УКРОРГСИНТЕЗ»;
- холодильник ;
- стерильні чашки Петрі;
- пробірки з кришками;
- пінцети;
- штатив для пробірок;
- парафінова стрічка;
- центрифуга ELMi CM-6M;
- склянки для підготовки препаратів до гібридизації;
- мікроскоп XS-3330 LED MICROmed;
- банки скляні з кришкою на 10/20 мл;
- циліндр 50 мл;

У процесі дослідження використали такі *реактиви*:

- вода дистильована;
- цитрат натрію «ХімКомпонент» ;
- середовище RPMI-1640 «Gibco»
- колхіцин AppliChem
- метиловий спирт «Sigma Aldrich»;
- крижана оцтова кислота «Sigma Aldrich»;
- 0,25% розчин трипсину «Gibco»
- фосфатний буфер (pH 6,8) GURR Buffer «Gibco»
- барвник Гімза
- імерсійне масло без флуоресценції «МініМед»
- трипсин-ЕДТА «Sigma Aldrich»
- UltraPure 20XSSC
- Thermo Scientific Surfact-Amps NP-40
- барвник DAPI II «Invitrogen»
- флуоресцентні проби для хромосом 13,18, 21, X, Y (Vysis, Abbott, USA)

## 2.2 Об'єкт та методи дослідження

Об'єктом для дослідження виступає хоріон - це зовнішня оболонка, що оточує ембріон і є його сполучною ланкою з організмом матері. Його формування починається після другого тижня вагітності. Хоріон кріпиться до внутрішньої стінки матки за допомогою ворсинок.

Його структура представлена у вигляді білого кільця з хвилястими обрисами. Без хоріона неможлива життєдіяльність плода. Це пояснюється тим, що за допомогою даної оболонки:

- відбувається газообмін між ембріоном і вагітною жінкою;
- здійснюються видільна і трофічна функції;
- плід позбавлений негативного впливу хвороботворних агентів.

Якщо в своєму висновку лікар вказує, що структура цього органу не змінена, процес виношування плода протікає в стандартному режимі. В іншому випадку мають місце порушення перебігу вагітності.

Таким чином, хромосомний набір хоріона відповідає каріотипу плода, тому генетичне дослідження ворсин хоріона може виявити хромосомні порушення, що стали причиною спонтанного переривання вагітності.

Проведення дослідження хромосомних аномалій біоматеріалу надає змогу оцінити причини переривання вагітності, а також уникнути можливості повторних спонтанних завмерлих вагітностей.

### **2.2.1 Методика проведення методу класичного каріотипування біоматеріалу**

На одного пацієнта приготували 6 пробірок, що були попередньо нагріті до  $+37^{\circ}\text{C}$ . У 3 пробірки внесли по 2 мл 1,0 % розчину цитрату натрію, у інші 3 пробірки – по 4 мл 0,9 % розчину цитрату натрію.

Помістили відібраний хоріону у пробірки з розчинами цитрату натрію. Додати по 2 краплини розчину колхіцину піпеткою у пробірки з 1,0 % цитратом натрію та по 3 краплини у пробірки з 0,9 % цитратом натрію та перемішали так, щоб ворсини залишилися у розчині. Помістили пробірки в термостат ( $+37^{\circ}\text{C}$ ) на 40 хв.

Після інкубування з колхіцином із пробірок з 4 мл 0,9 % цитратом натрію відібрали 2 мл розчину і злили. Далі краплинами додавали 3 мл фіксуючої суміші та залишили за кімнатної температури на 50 хв. Потім повністю злили фіксуючу суміш і внесли 4 мл свіжої суміші. Через 30 секунд знову замінили на свіжу фіксуючу суміш. Із пробірок з 2 мл 1,0 % цитрату натрію відібрали весь розчин і злили. Внесли 2 мл фіксуючої суміші по краплинам і одразу злили її. Внесли 4 мл фіксуючої суміші, залишили на 30 секунд. Замінили на свіжу фіксуючу суміш і помістити у морозильну камеру ( $-18^{\circ}\text{C}$ ).

Через 4 години на кожну пробірку підготували по 2 предметних скельця. Дістали з пробірки ворсинки хоріону та зняли з них надлишок фіксатора фільтрувальним папером. Попередньо підготовлене предметне скельце підігріли та нанесли на нього краплину 60% оцтової кислоти. Помістили у цю краплину біоматеріал та підігріли 20 секунд над спиртовою горілкою. Ворсинки перенесли на інше скельце у свіжу краплину 60% оцтової кислоти, а суспензію клітин після мацерації перемішати і розподілили по усьому скельцю. Препарат змили фіксуючою сумішшю, залишки фіксатора зняли серветкою, скельце трохи підсушили над полум'ям горілки і залишили до повного висихання при кімнатній температурі. Препарат на другому скельці підготували аналогічно. Витримали препарати за температури 37°C протягом 5 днів.

Далі, фарбували препарати. Для цього занурили препарат у 0,25 % розчин трипсину на 2 секунди та струснули препарат для видалення залишків розчину трипсину. Промили препарат у фосфатному буфері (pH 6,8). Одразу на препарат нанесли робочий розчин барвника Гімза. Фарбували 6 хв. Змили водогінною водою та сполоснути дистильованою водою.

Аналіз препаратів здійснювали під світловим мікроскопом XS-3330 LED MICROmed при збільшенні x1000, програма аналізу хромосом Lucia із використанням імерсійного об'єктива.

### **2.2.2 Метод FISH-аналізу**

Підготовку ворсин хоріона здійснювали аналогічно до методу класичного каріотипування. Після цього проводиться, безпосередньо, підготовка препарату до гібридизації.

Для цього відмітили алмазним олівцем на предметному скельці зони гібридизації та помістили їх на 30 хв у розчин 2xSSC за температури 37°C. Далі ввімкнули водяну баню, помістили склянку з розчином для денатурації та

нагріли до +73°C. Потім ми занурили скельця у 70% розчин етанолу і відразу перенесли у 85% розчин етанолу, залишили на 2 хвилини. Таким чином інкубували скельця протягом 2 хв у спиртовому розчині 96% етанолі. І після, висушили скельця на повітрі.

Наступним етапом для постановки аналізу є процес денатурації ДНК інтерфазних ядер клітин. Для цього у розчин для денатурації, попередньо нагрітий до +73°C, занурили предметні скельця та витримали 10 хвилин.

Використовуючи пінцет перенесли скельця з розчину для денатурації у 70% спиртовий розчин та інкубували 2 хвилини. Потім перенесли скельця у 85% розчин на 2 хвилини та у 96%, відповідно.

Наступним кроком є етап гібридизації, який подитьоровся винятково в темному приміщенні, адже в процесі задіяні ДНК-зонди. Для проведення процедури ми розморозили проби за кімнатної температури. Перемішали за допомогою вортекса та розвели проби у буфері для гібридизації.

Нагріли препарати у термостаті до 37°C та одразу капнули 10 мкл проби у зону відміченого поля на предметному скельці та накрити покривним склом 24x24. Зверху зафіксували парафіном та помістили препарат до гібридизаційної камери, увімкнули прилад.

Останнім передінтерпретаційним етапом є пост-гібридизаційне відмивання препарату. Для цього налили розчин 0,3 % NP-40/4xSSC та нагріли на водяній бані до +73°C. А в іншу склянку налили 0,1 % розчин NP-40/2xSSC та залишили за кімнатної температури. Дістали скельця з гібридизатора, зняли парафін разом з покривним скельцем та швидко перенесли у розчин 0,3 % NP-40/4xSSC, струснули та інкубували 2 хвилин. Промили препарати у 0,1 % NP-40/2xSSC протягом 1 хвилини, змили дистильованою водою та підсушили скельця. Додали 2 мкл DAPI II на кожную зону гібридизації та накривили покривним скельцем.

Аналіз гібридизаційних сигналів проводили у темній кімнаті під флуоресцентним мікроскопом. Провели аналіз сигналів хромосом 13,21 та 18,

X, Y або ж за вимогою проводили дослідження відразк на 9 хромосом із використання об'єктиву x100 та занотували кількість інтерфазних ядер із сигналами.

### 2.2.3 Методика аналізу методом NGS

Для аналізу використовували секвенатор Ions Torrent NGS. Методику проведення аналізу зображено на рис. 1.

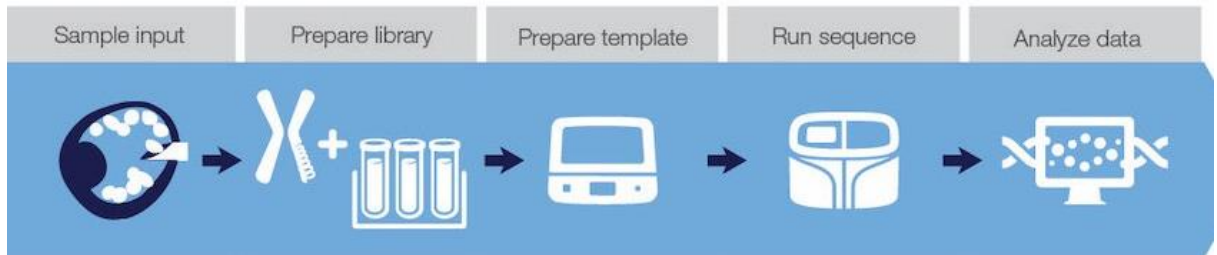


Рис. 2.1 Методика проведення NGS аналізу за допомогою секвенатора ns Torrent [56]

Зразок дослідження ставили на ампліфікацію всього генома. Побудували бібліотеку фрагментів для підготовки зразків для секвенування за допомогою набору ion reproseq pgs. Далі проходив етап ізотермічної ампліфікації. На даному етапі ми підготували шаблон за допомогою технології швидкої ізотермічної ампліфікації для запуску секвенування в системі Ion PGM. I, останнім кроком було проведення аналізу даних для виявлення анеуплоїдій за допомогою програмного забезпечення Ion Reporter.

Дана методика використовується для виявлення анеуплоїдій або хромосомних аномалій у всіх 24 хромосомах (22 аутосоми та X та Y хромосоми), включаючи трисомію 21 (синдром Дауна) та моносомію X (синдром Тернера).

Таким чином, після проведення досліджень, можемо сказати про доцільність використання кожного методу. Так, метод класичного каріотипування можемо використовувати лише для дослідження кількісних порушень хромосомного набору та виключно для зразків, у яких збереглися живі клітини, тобто ті, що здатні до поділу. FISH каріотипування доцільно

проводити, коли нас цікавлять конкретно визначені хромосомні сигнали, перевагою даного методу є можливість використання для зразків, завмирання яких було виявлено через певний період часу (більше доби), відповідно клітини вже втратили здатність до мітотичного поділу. NGS метод дає змогу використовувати ворсини хоріона, клітини якого що вже не живі. У тих випадках, коли повний каріотип досліджувати не вдалося, а результат скринінгу анеуплоїдій окремих хромосом методом FISH нормальний, то є сенс провести NGS дослідження, адже він визначає кількість ДНК певної хромосоми в межах геному, тому саме даний метод дозволяє визначити ті перебудови, які не виявляє жоден інший метод аналізу.

## РОЗДІЛ 3.

## АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Схема експерименту:

**3.1 Каріотипування ворсин хоріона абортного матеріалу**

Для дослідження було проаналізовано 114 зразків, результати яких наведені у Додатку А. Приклад каріограм наведені нижче були отримані за допомогою світлового мікроскопа при збільшення 1x1000 на програмі Lucia.



Рис. 3.1 Приклад каріограми з каріотипом 47, XX, +22, що була отримана за допомогою світлового мікроскопа при збільшення 1x1000 на програмі Lucia

На рис.3.1 показано каріотип з хромосомним набором 47, XX, +22. Даний приклад є одним із найбільш частих випадків, що спричинюють завмирання вагітності. Саме трисомії за результатами досліджень виявляють у каріотипі ворсин хоріона плода. З діаграми 3.1, можна зробити висновок про те, що трисомії 22, 21 та 18 хромосоми лідирують за даної патології. При цьому, середній вік жінки становить 38 років, а термін спонтанного переривання вагітності не впливає на результати дослідження.



Також, як видно з діаграми 3.1, однією з поширених причин завмирання вагітностей є триплоїдія (рис. 3.2), що сягають 8% з проаналізованих зразків, вік жінок становив у середньому 36 років.



Рис. 3.2 Приклад каріограми з триплоїдним каріотипом, що була отримана за допомогою світлового мікроскопа при збільшенні 1x1000 на програмі Lucia

### 3.2 Застосування FISH-аналіз для дослідження абортного матеріалу

Дослідження методом FISH проводили зазвичай у випадках, коли пройшов певний період часу (біля доби) після завмирання і, відповідно, клітини втрачають мітотичний потенціал.

Вік	Результати дослідження FISH методом
31	Xx2, 18x2 [60], 13x2, 21x2[60]
32	Xx2, 18x2 [100], 13x2, 21x2[100]
33	Xx1, 18x2 [160], 13x2, 21x2[160]
33	Xx1, 18x2 [60], 13x2, 21x2[60]
34	Xx2, 18x2 [60], 13x2, 21x2[60]
34	Xx1, Yx1, 18x2 [80], 13x2, 21x2[80], 15x2, 16x2[80]
31	Xx2, 18x2 [30], 13x2, 21x2[30]
31	Xx1, Yx1, 18x2 [60], 14/22x4, 13/21x3[60], 15x2, 16x2[60]
28	Xx2, 18x2 [60], 14/22x4, 13/21x3[60], 15x2, 16x2[60]
39	Xx1, Yx1, 18x3 [60], 13x2, 21x2[60], 14/22x4 [60], 15x2, 16x2[60]
30	Xx2, 18x2 [60], 13x2, 21x2[60]
38	Xx2, 18x2 [60], 14/22x4, 13/21x4[60], 15x3, 16x2[60]
37	Xx1, Yx1, 18x2 [80], 14/22x4, 13/21x4[80], 15x2, 16x2[80]
29	Xx3, 18x3 [70], 13x3, 21x3[70], 15x3, 16x3[70]
21	Xx2, 18x2 [30], 14/22x4, 13/21x4[30], 15x2, 16x2[30]
30	Xx2, 18x2 [70], 3/21x4[70], 15x2, 16x2[70]
40	Xx1, Yx1, 18x2 [55], 13x2, 21x3[55]
42	Xx1, Yx1, 18x2 [50], 13x2, 21x2[50]
40	Xx1, Yx1, 18x2 [50], 13x2, 21x3[50]
33	Xx2, 18x2 [60], 14/22x4, 13/21x3[60], 15x2, 16x2[60]
34	Xx1, Yx1, 18x2 [50], 14/22x4, 13/21x4[50], 15x2, 16x2[50]
32	Xx1, Yx1, 18x2 [60], 13x2, 21x2[60]
29	Xx2, 18x2 [80], 13x2, 21x2[80], 15x2, 16x2[80]
27	Xx1, Yx1, 18x2 [90], 13x2, 21x2[90]
33	Xx2, 18x2 [50], 13/21x4[50], 15x2, 16x2[50]
25	Xx2, 18x2 [60], 13x2, 21x2[60]
28	Xx1, Yx1, 18x2 [35], 13x2, 21x2[35]
37	Xx2, 18x2 [30], 14/22x4, 13/21x2, 15x2, 16x2[30]
26	Xx2, 18x2 [60], 13x2, 21x2[60]
39	Xx2, 18x2 [60], 13x2, 21x2[60], 15x2, 16x2[60]
43	Xx2, 18x2 [50], 14/22x4, 13/21x4[50], 15x2, 16x2[50]
22	Xx2, 18x2 [40], 13x2, 21x2[40]
31	Xx1, Yx1, 18x2 [40], 14/22x4, 15x2, 16x2, 13/21x4, [40]
37	Xx2, 18x2 [50], 13x2, 21x2[50]

У таких випадках зразок направляється на FISH або NGS дослідження. Ще одним варіантом проведення FISH аналізу є вказані у направленні конкретні хромосоми, які ми повинні перевірити.

Дослідження проводили при збільшення x1000, програма, що використовувалась для аналізу сигналів Isis (Zeiss). Результати аналізу наведені у табл. 3.2

Табл. 3.2 Результати аналізу FISH методом

На рис.3.3 та рис. 3.4 наведено хромосомні сигнали, що були отримані FISH методом.

Проведено дослідження некультивованих клітин хоріона (інтерфазних ядер) із використанням молекулярно-цитогенетичного методу FISH (суміш центромерних проб до хромосом X, Y, 18, проби CEP 15, CEP 16, CEP 13/21, CEP 14/22 Alpha Satellite, (Cytocell Aquarius, UK). Кількість проаналізованих ядер для кожної суміші проб - 50

**Результат:** nuc ish(DXZ1x1,DYZ3x1,D18Z1x2),( D13Z1/D21Z1,D14Z1/D22Z1)x4,(D15Z4,D16Z3)x2

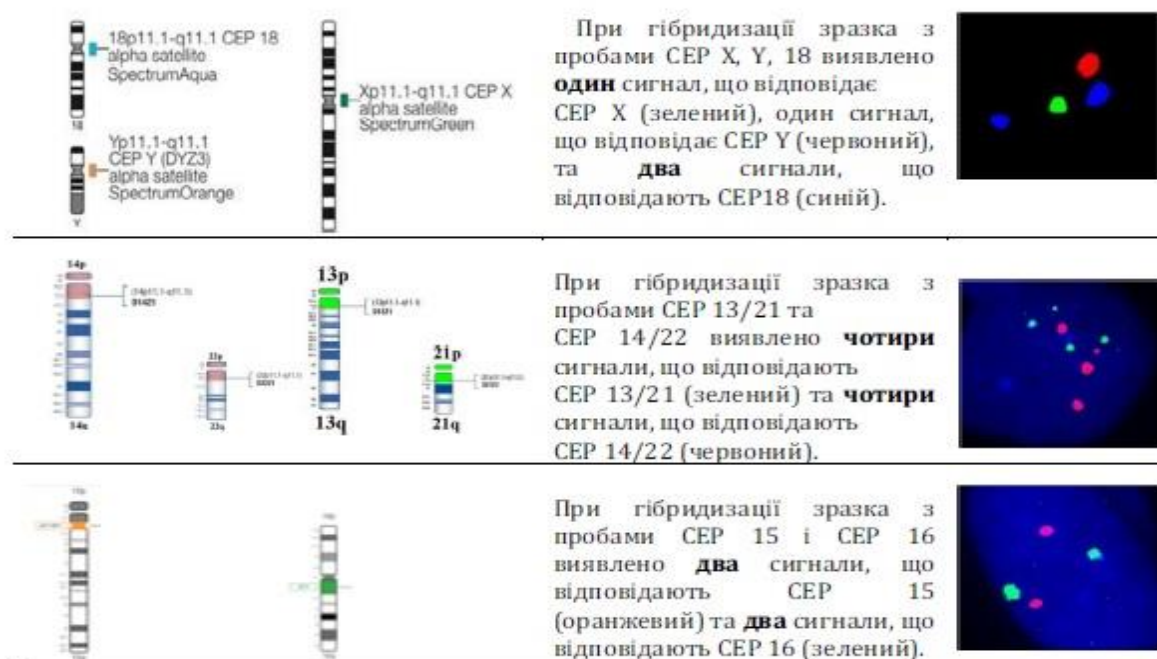


Рис. 3.3 Результати дослідження методом FISH, збільшення x1000

З рис.3.3 видно, що зразок ознак анеуплоїдій хромосом X, Y, 13/21, 15, 16, 18, 14/22 не виявлено. Кількісне співвідношення сигналів свідчить про чоловічий каріотип клітин хоріона.

Проведено дослідження некультивованих клітин хоріона (інтерфазних ядер) із використанням молекулярно-цитогенетичного методу FISH (суміш центромерних проб до хромосом X, Y, 18, проби CEP 15, CEP 16, CEP 13/21, CEP 14/22 Alpha Satellite, (Cytocell Aquarius, UK). Кількість проаналізованих ядер для кожної суміші проб – 50.

**Результат:** nuc ish(DXZ1x1,DYZ3x1,D18Z1x3),(D13Z1/D21Z1,D14Z1/D22Z1)x4,(D15Z4,D16Z3)x2

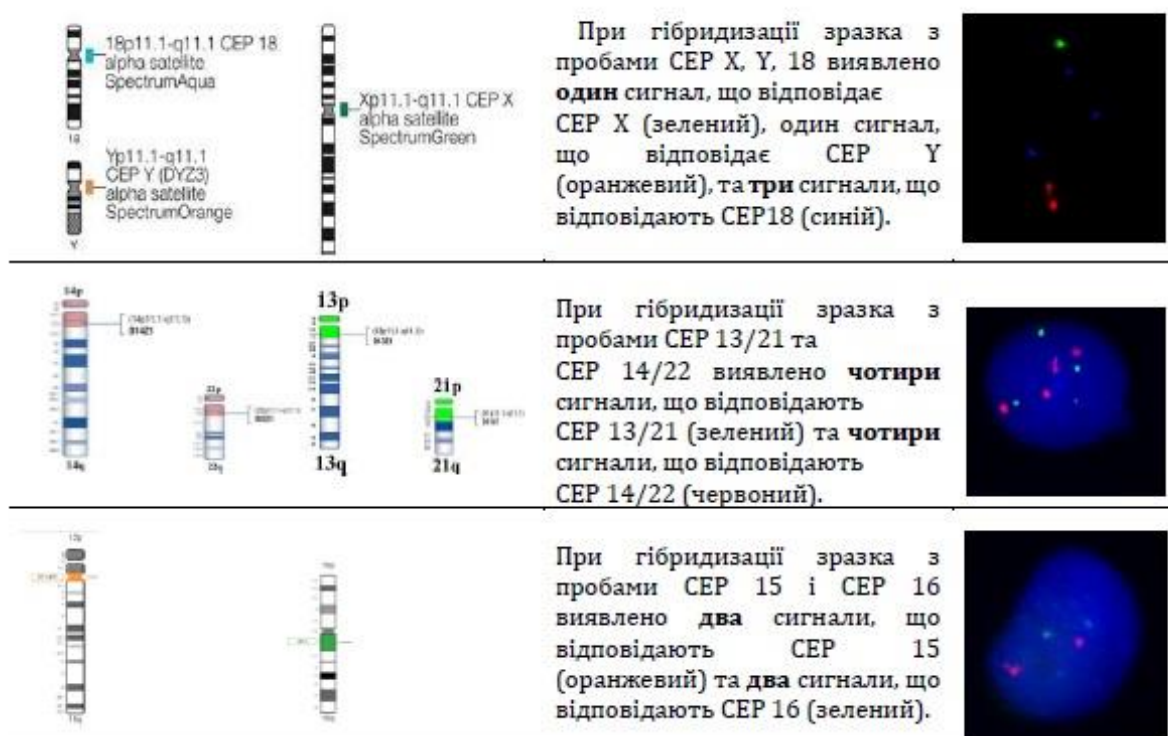


Рис. 3.4 Результати дослідження методом FISH

А вже з рис.3.4 бачимо, що співвідношення сигналів свідчить про чоловічий каріотип клітин хоріона з трисомією хромосоми 18. Ознак анеуплоїдії інших аналізованих хромосом не виявлено.

### 3.3 NGS аналіз ворсин хоріона абортного матеріалу

За допомогою NGS методу можна дослідити ворсини хоріона завмерлого в своєму розвитку плода, навіть якщо завмирання відбулося більше декількох діб. Якщо даний аналіз показує, що хромосомна патологія

відсутня, то в такому випадку причиною завмирання вагітності був якийсь інший фактор. Для проведення аналізу було взято 10 зразків абортного матеріалу.

На рис. 3.5 за результатом дослідження абортного матеріалу ворсин хоріона виявлено трисомію хромосоми 18 та середньорівнева мозаїчна моносомія хромосоми 19.

<b>Опис</b>	<i>seq[GRCh37] (18)x3,(19)x1~2</i>
<b>Висновок</b>	<i>Трисомія хромосоми 18, середньорівнева (50%) мозаїчна моносомія хромосоми 19, стать - чоловіча</i>

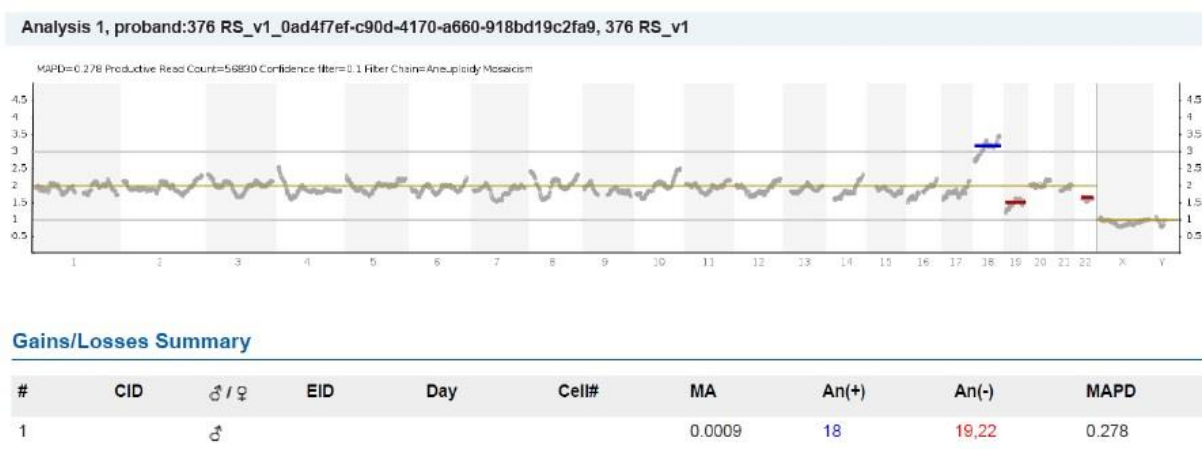


Рис. 3.5 Аналіз ворсин хоріона аб/м NGS методом, чоловічий каріотип з трисомією хромосоми 18

<b>Опис відхилення</b>	<i>21q11.2q22.3x2.25</i>
<b>Висновок</b>	<i>Мозаїчна трисомія хромосоми 21, стать- жіноча</i>

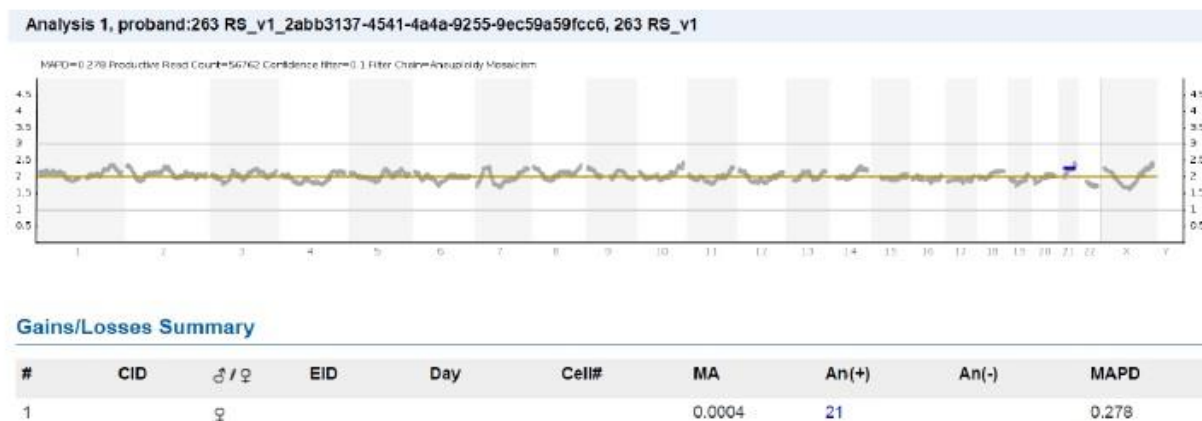


Рис. 3.6 Аналіз ворсин хоріона абортного матеріалу NGS методом, жіночий каріотип з мозаїчною трисомією хромосоми 21

З результатів аналізу NGS методом, що наведені у табл.3.3., бачимо, що 30% - це зразки, у яких не виявлено порушень хромосомного набору. 20% із проаналізованих результатів мають трисомію хромосом 18, 15, 50% з яких, у свою чергу мають додаткові перебудови у хромосомному наборі. І в 40% із проведеного дослідження виявлено мозаїчну моносомію. При цьому у 20%, із даних зразків мають комбіновані порушення.

Табл. 3.3 Результати проведених досліджень NGS методом

<b>Вік жінки</b>	<b>Результати аналізу NGS методом</b>
36	Порушень хромосомного набору не виявлено
38	Порушень хромосомного набору не виявлено
44	47, XY, +15
40	Мозаїчний варіант (40-60%) трисомії хромосоми 22
32	50% мозаїчна моносомія хромосоми 19 65% мозаїчна трисомія хромосоми 22
32	47, XY, +18 50% мозаїчна моносомія хромосоми 19
29	40% мозаїчна моносомія хромосоми хромосоми 19
36	Мозаїчна моносомія середнього рівня хромосоми 16, 19
31	Моносомія середнього рівня хромосом 19, 21, 22
26	Порушень хромосомного набору не виявлено

Таким чином, можемо зробити висновки щодо практичного використання різних методів скринінгу та їх ефективності. Метод класичного

каріотипування доцільно використовувати для визначення кількісних перебудов та зразків, клітини якого здатні до мітотичного поділу. Перевагами даного методу вважається аналіз структури та кількості безпосередньо хромосом, виявлення збалансованих транслокацій. Але класичне каріотипування не дає змоги визначити мікрохромосомні перебудови (делецій, дуплікацій, інверсій), а якість аналізу залежить від якості препаратів.

Щодо FISH-аналізу, то він дає можливість визначення мікрохромосомних перебудов (делецій, дуплікацій, інверсій), добре відтворений метод аналізу, можна проводити аналіз на культурах клітин з низькою мітотичною активністю, фіксованих клітинах. Але це таргетний аналіз, тобто має залежність від специфічності використовуваного ДНК-зонда.

NGS визначає кількість ДНК певної хромосоми в межах геному, тому саме він дозволяє визначити ті перебудови, які не виявляє жоден інший метод аналізу. Але, при цьому варто наголосити, що метод не може бути використаний в якості єдиного для виявлення всіх хромосомних мутацій абортного матеріалу. Так, за допомогою високопродуктивного секвенування не можуть бути виявлені великі делеції, хромосомні перебудови, поліплоїдії, а також не можуть бути оцінені рівні метилування, варіацій числа повторів. Таким чином, метод NGS має ряд переваг перед іншими методами дослідження хромосомних аномалій. Завдяки постійному зменшенню вартості, високій продуктивності, а також широким можливостям метод найближчим часом набуде ширшого використання задля якісної та достовірної діагностики великого спектру генетичних аномалій.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Етіологія спонтанних викиднів є різноманітною. Однією із причин, що викликає завмирання вагітності чи вимушене її переривання є генетичними хромосомними мутаціями. Причиною ранньої зупинки розвитку ембріона в першому триместрі вагітності в 60% випадків мають місце незбалансовані хромосомні аномалії.

Від 10 до 15% усіх клінічно визнаних вагітностей призводить до самовільного аборту. Приблизно чверть усіх жінок зазнає принаймні одного викидня протягом життя. До 5% усіх пар стикаються з повторними викиднями.

Нині снує багато методів дослідження абортного матеріалу. Зазвичай у якості досліджуваного матеріалу використовують ворсини хоріона, його хромосомний набір відповідає каріотипу плода, тому генетичне дослідження ворсин хоріона може виявити генетичні порушення, що стали причиною самовільного аборту. Серед поширених методів дослідження абортного матеріалу є класичне каріотипування – стандартне цитогенетичне дослідження, секвенування ДНК, метод порівняльної геномної гібридизації, FISH аналіз.

Так, наприклад метод класичного каріотипування абортного матеріалу з'явився у 1960-х роках. Для проведення дослідження використовують живі клітини, що знаходяться у метафазі мітозу, тому від давності завмирання ембріону залежить успіх аналізу. Зазвичай за допомогою стандартного каріотипування можна визначити каріотипи завмерлої вагітності в середньому у 70% випадків. Метод має свої переваги та недоліки. До мінусів проведення такого методу слід віднести те, що він не виявляє мікрохромосомні перебудови, а також неможливо провести без наявності клітин, що діляться.

Перевагами вважається здатність аналізувати структуру і кількість хромосом, виявляти транслокації, маркерні хромосоми та мозаїцизм. А враховуючи високу вартість більш точних досліджень, стандартне каріотипування залишається найбільш доступним.

FISH аналіз, або метод флуоресцентної *in situ* гібридизації добре виявляє анеуплоїдії, мозаїцизм, ідентифікує множинні маркерні хромосоми, виявляє числові і структурні хромосомні аберації, багато мікрохромосомних аномалій і комплексних перебудов генома. Перевагами флуоресцентної гібридизації є швидкість отримання результатів, і можливість застосування після медикаментозного аборту.

Метод порівняльної геномної гібридизації (CGH - Comparative Genomic Hybridization) відноситься до високотехнологічного молекулярно-цитогенетичного методу аналізу, що дозволяє провести скринінг всього геному в одній реакції. Метод має ряд переваг: Для проведення аналізу не потрібна наявність живих клітин, а відсутність необхідності у підготовці хромосомних препаратів дає можливість проводити аналіз на будь-якому матеріалі, з якого можна отримати ДНК. Крім переваг, метод CGH має свої недоліки. Технологія виявляє геномні дисбаланси – делеції та дуплікації, але не дає інформацію про їх походження. Всі структурні перебудови, що не змінюють кількість хромосомного матеріалу в геномі, не діагностуються: транслокації, інверсії, інсерції.

Секвенування (від англ. Sequence - «послідовність») - це назва сукупності методів, що дозволяють встановити точну послідовність нуклеотидів А, Т, G і С в полінуклеотиді, який кодує різноманітні білки.

Проведення дослідження абортного матеріалу дає змогу оцінити причини переривання вагітності, та можливі шляхи уникнути спонтанних абортів в майбутньому. Метод Сенгера – кращий метод для виявлення коротких тандемних повторів і секвенування окремих генів. Однак найбільшим недоліком цього методу, є кількість часу, який він потребує, що

пов'язано з низькою пропускнуою спроможністю. Метод може обробляти лише відносно короткі послідовності ДНК (до 300-1000 пар основ) одночасно.

Секвенування другого покоління (NGS – next generation sequencing) відноситься до високопродуктивних технологій секвенування ДНК, які можуть секвенувати мільйони і мільярди ланцюгів ДНК.

У роботі було використано три методи для дослідження абортного матеріалу: класичне каріотипування, FISH та NGS.

Після проведення дослідження та аналізу результатів, що були отримані, можемо зробити наступний висновок: завмирання плода у 67% із 114 зразків, що були взяті для проведення дослідження методом класичного каріотипування, відбулося через наявність хромосомних порушень. У 48% це була наявність трисомій у хромосомному наборі та у 8% поліплодії. Методом FISH аналізу було виявлено патологію у 19% із 36 проаналізованих зразків. За допомогою NGS аналізу було проаналізовано 10 зразків з яких у 30% - не виявлено порушень хромосомного набору. В 20% із проаналізованих результатів було виявлено трисомію, а в 40% виявлено мозаїчну моносомію, при цьому у 20%, із даних зразків мають комбіновані порушення.

Також, застосовуючи різні методи скринінгу для дослідження хромосомних аномалій біологічного матеріалу після спонтанного переривання вагітності з проаналізованої групи, що нараховувала 159 зразків, можна зробити висновок, щодо виявлення причин завмирання плода, їх залежність від вікового фактору та терміну гестації, на якому відбулося спонтанне переривання вагітності.

## ВИСНОВКИ

1. Виконано та проаналізовано отримані дані ДНК-діагностики хромосомних аномалій методом NGS. NGS методом було проаналізовано 10 зразків та визначено, що 30% - це зразки, у яких не виявлено порушень хромосомного набору. Також у 20% із проаналізованих результатів було виявлено трисомію і 50% з яких мають додаткові перебудови у хромосомному наборі. В 40% із проведеного дослідження виявлено мозаїчну моносомію, при цьому у 20%, із даних зразків мають комбіновані порушення. Але, враховуючи той фактор, що кількість досліджень невелика, унаслідок вартості проведення аналізу, то для остаточних висновків варто продовжувати дослідження.

2. Проведено аналіз абортного матеріалу за допомогою методу класичного каріотипування. Було визначено, що завмирання плода у 67% із 114 зразків, відбулося через наявність хромосомних порушень. У 48% це була наявність трисомій у хромосомному наборі та у 8% поліплодії.

3. Виконано аналіз абортного матеріалу методом FISH. При проведенні даного аналізу – патологію було виявлено у 19% із 36 проаналізованих зразків.

4. Вивчено можливості та обмеження NGS. Метод визначає кількість ДНК певної хромосоми в межах геному, тому завдяки цьому є можливість визначення перебудов, які не виявляють інші методи аналізу. Але недоліком є той факт, що за допомогою високопродуктивного секвенування не можуть бути виявлені великі делеції, хромосомні перебудови, поліплодії, а також не можуть бути оцінені рівні метилування, варіацій числа повторів.

5. Також можемо зробити висновки щодо репродуктивного віку жінки, то можемо сказати, що найчастіше хромосомні патології у завмерлого плода виявляються після 34 років, а особливо це стосується трисомій. Також, після проведеного дослідження біологічного матеріалу в діапазоні 6-11 тижнів гестації не спостерігається тенденції залежності виявлення хромосомних аномалій від тижня спонтанного переривання вагітності.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Лебедев И.Н. Молекулярно-цитогенетическая характеристика хромосомных аномалий при анэмбрионии и неразвивающейся беременности (2001): 25 с.
2. R. Rai, L. Regan. Recurrent miscarriage (2006): 601-611 p.
3. M. Stephenson, W. Kutteh. Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss (2007): 132-145 p.
4. Генетическое исследование клеток ворсин хориона неразвивающейся беременности. [Электронный ресурс] – URL: <https://www.yamed.ru/services/genetika/issledovanie-vorsin-horiona-nerazvivayushheysya-beremennosti/>
5. Gardner R. J. M. Chromosome abnormalities and genetic counseling (2012): 634 p.
6. Lamb N.E. Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21 (2005): 91–99 p.
7. Menasha J. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from 12-year study (2005): 251-263 p.
8. Lomax B. Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions (2000): 1516–1521 p.
9. Neuber M. Polyploidies in abortion material decrease with maternal age (1993): 563–566 p.
10. Бочков Н.П. Наследственные болезни (2012): 936 с.
11. Gersen, S. L. The Principles of Clinical Cytogenetics (2013): 569 p.

12. Reddy, K.S. Double trisomy in spontaneous abortions (1997): 339-345 p.
13. Schaaf, C.P. Human genetics: from molecules to medicine (2012): 397 p.
14. Kirchhoff, M. High resolution comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics (2001): 740-744 p.
15. Кариотипирование и FISH-анализ. [Электронный ресурс] – URL: <https://www.dia-m.ru/catalog/lab/kariotipirovanie-i-fish-analiz/>
16. Kallioniemi, O.P. Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors (1993): 41-46 p.
17. Kallioniemi, A. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors (1992): 818-821 p.
18. Wilton, L. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization (2001): 1537-1541 p.
19. Zitzelsberger, H. Comparative Genomic Hybridization for the Analysis of Chromosomal Imbalances in Solid Tumors and Hematological Malignancies (1997) 403-417 p.
20. Yu, L.C. Objective Aneuploidy Detection for Fetal and Neonatal Screening Using Comparative Genomic Hybridization (1997) 191-197 p.
21. Moore, E. Widespread Chromosomal Abnormalities in High-Grade Ductal Carcinoma In Situ of the Breast: Comparative Genomic Hybridization Study of Pure HighGrade DCIS (1999): 403-409 p.
22. Karhu, R. Quality control of CGH: impact of metaphase chromosomes and the dynamic range of hybridization (1997): 198-205 p.
23. Kirchhoff, M. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals (1998): 163-173 p.
24. Цитогенетическое исследование (кариотип) хориона. [Электронный ресурс] – URL: <https://dnkom.ru/analizy-i-tseny/tsitogeneticheskie->

[issledovaniya/tsitogeneticheskoe-issledovanie-kariotip-khoriona-khorion-biopsiya-1-embrion/](#)

25. Solinas-Toldo S. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances (1997): 399-407 p.
26. Shaffer, L.G. Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases (2006): 98-102 p.
27. Russel, K. Fluorescence in situ hybridization (FISH) methods for medical genetics: approved guideline (2004).
28. Kjeldsen, E. FISH technique, FISH probes and their applications in medicine and biology-an overview, in FISH Technology (2002): 3–50 p.
29. Ravnan, J.B. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities (2006) 478–489 p.
30. Chudoba, I. High resolution multicolorbanding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes (1999): 156–160 p.
31. Бородинов А.Г., Манойлов В.В., Заруцкий И.В. Поколения методов секвенирования ДНК (2020): 3-20 с.
32. Бархатов И.М., Предеус А.В., Чухловин А. Б. Секвенирование нового поколения и области его применения в онкогематологии (2016): 8 с.
33. Ross J.S., Cronin M. Whole cancer genome sequencing by next-generation methods (2011): 527–539 p.
34. Voelkerding K., Damed S. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics (2009): 641-658 p.
35. Ansorge W. Next-generation DNA sequencing techniques (2009): 195-203 p.
36. Huang Y., Chen S., Chiang Y. Palindromic sequence impedes sequencing-by-ligation mechanism (2012)
37. Golan D., Medvedev P. Using state machined to model the Ion Torrent sequencing process and to improve read error rates (2013): 13 p.

38. Ambardar S., Gupta R. High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry (2016): 394-404 p.
39. Применение секвенирования нового поколения. [Электронный ресурс] – URL: <https://www.laboratorii.com/stati/primenenie-sekvenirovaniya-novogo-pokoleniya-.html>
40. Смирнов А.М., Зайцева М.А., Павлов А.Е., Перспективы применения метода секвенирования следующего поколения в клинической практике скрининга новорожденных (2013). [Электронный ресурс] – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/perspektivy-primeneniya-metoda-sekvenirovaniya-sleduyuschego-pokoleniya-ngs-v-klinicheskoy-praktike-skrininga-novorozhdennyh/viewer>
41. Ari S., Arikani M. Next-generation sequencing: advantages, disadvantages, and future (2016): 109-135 p.
42. Ardui S. Ameer A. Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age (2018): 2159-2168 p.
43. Lu H., Giordano F. Oxford Nanopore MinION sequencing and genome assembly (2016): 265-279 p.
44. Воинова В.Ю., Николаева Е.А., Щербакова Н.В., Яблонская М.И. Высокопроизводительное секвенирование ДНК для идентификации генетически детерминированных заболеваний в педиатрической практике (2019): 64 с.
45. B. Carvalho, S. Doria, C. Ramalhob. Aneuploidies detection in miscarriages and fetal deaths using multiplex ligation-dependent probe amplification: an alternative for speeding up results (2010): 151-155 p.
46. Берешева А. К. Роль молекулярно-цитогенетической диагностики в генетическом консультировании супружеских пар с нарушением репродуктивной функции. Харьков (1995).
47. M. Goddijn, N.J. Leschot, Genetic aspects of miscarriage (2000): 855-865 p.

48. Баранов, В.С. Цитогенетика эмбрионального развития человека. Санкт-Петербург (2007): 640 с.
49. Menasha, J., Levy, B., Hirschhorn, K., Kardon, N.B. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions (2005): 251-263 p.
50. Pylyp, L.Y., Spynenko, L.O., Verhoglyad, N.V. Chromosomal abnormalities in products of conception of first-trimester miscarriages detected by conventional cytogenetic analysis: a review of 1000 cases (2018): 265-271 p.
51. Turnpenny P.D, Ellard S. Chromosomes and cell division, Emery's Elements Of Medical Genetics 12th edition (2005): 31-59 p.
52. Гинтер, Е.К. Медицинская генетика (2003): 448 с.
53. Merel, M.J. Genetics of early miscarriage (2012): 1951-1959 p.
54. Russo, R., Sessa, A.M., Fumo, R. Chromosomal anomalies in early spontaneous abortions: interphase FISH analysis on 855 FFPE first trimester abortions (2016): 186-191 p.
55. Веропотвелян Н.П., Погуляй Ю.С., Саваровская Е.С. Распространённость и спектр хромосомных аномалий среди спонтанных и индуцированных ранних репродуктивных потерь (2020): 8-19 с.
56. [Электронный ресурс] – URL:  
<https://www.thermofisher.com/ua/en/home.html>

## ДОДАТКИ

## Додаток А

Термін вагітності (тиждень)	Результати дослідження	Вік жінки
8	46,XX	36
7	46,XY	24
8	47,XY,+16	42
10	46,XY	24
12	46,XY	35
9	45,X	31
13	69,XXX	36
17	46,XY	36
6	46,XY	36
10	47,XY+18	39
8	47,XX+13	36
6	46,XY	42
7	47,XX+10	36
9	47,XY+10	34
6	47,XY+22	34
6	46,XY	30
12	46,XY	32
8	69,XXX	38
12	45,X,9 ph	26
9	47,XY+18	42
5	48,XY+2,+21	40
8	45,X	38
9	69,XXY	28
7	46,XX	27
7	47,XX+16	29
6	47,XY+22	48
5	47,XX+21	30
12	69,XXX	36
8	45,X	35
13	46,XY	33
6	46,XX	34
8	46,XY	35

8	47,XX+9	51
11+6	92,XXXX	28
6	45,X	35
8	46,XY	34
10	69,XXY	29
12	45,X	30
10	46,XX	33
12+	47,XX,+21	34
7	46,XY	23
9	45,X	41
8	47,XX,+22	39
8	47,XX,+13	43
11	47,XY,+9	39
9	47,XX+16	34
10	45,X	35
7	46,XY	34
7	69,XXY	30
10	46,XX	28
10	46,XX	27
8	69,XXY	34
8	47,XY,+22	44
9	47,XY,+16	29
13	47,XY,+18	38
11+3	47,XY,+18	45
7	47,XX+15	39
7	46,XX	22
12	47,XX,+22	39
7	47,XX,+22	45
13	3n	29
10	45,X	33
9	47,XY,+18	37
7	47,XY,+18	42
8	47,XY,+18	37
10	45,X	33
3	45,X	28
7	47,XY,+16	36
5	47,XY,+17	34
7	47,XX,+15	41
8	47,XY,+15	40
8	47,XY,+16	41
8	47,XY,+14	29
9	46,XY	38

9	47,XY,+21	40
9	47,XY,+3	34
8	46,XY	35
11	47,XY,+21	43
13	46,XY	33
7	46,XY	37
7	47,XX,+mav	25
14	47,XX,+13	31
8	46,XY	38
10	47,XX,+9	37
13	69,XXY	35
7	46,XX	28
8	46,XX	41
10	47,XY,+22	42
12	46,XY	26
8	47,XY,+12	43
9	47,XX,+21	36
10	46,XX,add(12)p(13)	37
8	69,XXY	36
12	92,XXXX	25
9	46,XY	26
11	46,XX	33
13	46,XY	35
11	47,XY,+21	40
7	47,XY,+13	36
9	46,XY	33
11	69,XXY	34
12	47,XY,+21	24
7	46,XX	37
13	46,XX	39
11	47,XY,+3	40
10	46,XY	29
11	46,XY	30
7	47,XY,+22	33
7	47,XX,+22	28
6	47,XY,+21	40
7	47,XX,+20	36
7	46,XX	30