

БИОХИМИЯ

УДК 576.3: [57.086.862+57.088.1]

DOI: 10.26456/vtbio288

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНА ПОЛА (SRY) ПЛОДА ЧЕЛОВЕКА В КРОВИ МАТЕРИ ПОСЛЕ 9-10 НЕДЕЛИ БЕРЕМЕННОСТИ

А.Н. Панкрушина, И.А. Калиничева, М.Н. Резникова

Тверской государственной университет, Тверь

Произведено определение пола плода в 433 образцах плазмы крови женщин, находящихся на 9 по 26 неделях беременности, из которых ген SRY был идентифицирован в 217 образцах (мужской пол), в 216 образцах ген SRY отсутствовал (женский пол). Выделение фетальной ДНК на спин-колонках и магнитных частицах и использование пробирок типа CPDA оказались наиболее предпочтительны для определения пола плода. Зависимости определения гена SRY от срока беременности и массы тела обследованных женщин обнаружено не было. Срок доставки образцов плазмы в течение 2-ух дней является наиболее оптимальным для анализа по определению пола.

Ключевые слова: *неинвазивная пренатальная диагностика, фетальная ДНК, ген пола– SRY.*

Введение. Фетальные клетки плода циркулируют в материнском кровотоке, в связи с чем их используют в качестве инструмента для неинвазивной пренатальной диагностики. Начиная с 1990-х годов исследования сконцентрировались на анализе внеклеточной свободно циркулирующей ДНК плода (внДНК), содержащейся в материнской плазме. Первая веха в исследованиях была положена профессором Деннисом Ло и др., которые показали наличие последовательностей Y-хромосомы в плазме беременных женщин с плодом мужского пола. С тех пор продолжают прогрессировать и усложняться анализ и практические методы исследования циркулирующей ДНК плода для неинвазивной диагностики различных заболеваний, а также определения пола и статус резус-фактора плода (Токарева, 2006). Очень низкое количество циркулирующей внеклеточной ДНК в материнской плазме является значительной проблемой, поэтому требуются специальные и оптимизированные методы очистки внДНК из материнской плазмы, а также чувствительные и специфичные методы ее обнаружения.

Идентифицировано более 100 заболеваний человека, наследование которых сцеплено с полом. Примерами таких заболеваний являются гемофилия, гипоплазия надпочечников,

мышечная дистрофия. Неинвазивное определение пола особенно актуально в семьях, где оба или один из партнеров является носителем мутации, проявление которой зависит от пола будущего ребенка. В частности, идентификация пола на ранних сроках беременности при наличии в анамнезе у родителей наследственной предрасположенности к врожденной гиперплазии надпочечников позволяет родить здоровую дочь (Баранов, 2015).

ПЦР-анализ в реальном времени широко применяется для определения резус-статуса плода из плазмы резус-отрицательных беременных женщин для выявления несовместимости резус-фактора между матерью и плодом с целью предотвращения возникновения гемолитической болезни новорожденного. В настоящее время профилактика анти-D иммуноглобулином проводится резус-отрицательным женщинам, родившим резус-положительного первенца. Введение в таких случаях метода неинвазивного генотипирования плода с использованием вкДНК предотвращает медикаментозную профилактику. Следует отметить, что определить резус-фактор и пол плода можно и с помощью инвазивных процедур таких как амниоцентез и взятие проб ворсинок хориона. Однако, эти процедуры связаны с высоким риском выкидыша в отличие от неинвазивной диагностики, которая проводится начиная с 9-10 недели беременности и совершенно безопасна как для беременной женщины, так и для будущего ребенка (Сидельникова, 2011).

Цель работы – определение гена пола (SRY) плода человека в крови матери после 9-10 недели беременности.

Задачи: 1. Сравнить методы выделения внеклеточной ДНК плода для определения гена пола (SRY). 2. Оценить влияние срока беременности на идентификацию гена SRY. 3. Изучить влияние массы тела матери на выявление гена пола (SRY). 4. Изучить влияние условий транспортировки биологического материала в лабораторию на результат анализа.

Методика. Экспериментальная часть работы проводилась на базе ООО «Медикал Геномикс» в 2020 году. Объектом исследования служила венозная кровь 433 беременных женщин со сроком не менее 9 недель гестации для анализа пола плода. Все данные пациентов были обезличены.

Пробоподготовка. Забор материала для неинвазивного определения пола плода осуществлялся в три типа пробирок с различным антикоагулянтом. 304 образцы забраны в пробирки типа CPDA, 28 образцов крови в пробирки Cell-Free DNA BCT (Sreck, США) объемом 10 мл и 19 образцов в пробирки LBgard (Biomatrix, США) на 8,5 мл. Образцы центрифугировали 10 минут при 2048g, при непрерывном охлаждении до +4°C. После центрифугирования и

оседания форменных элементов крови из пробирки отбирали верхний слой плазмы и переносили его в отдельную стерильную пробирку типа «Эппендорф». на 1,5 мл. Плазму повторно центрифугировали 10 мин при 16000g gpf. После повторной открутки отбирали вновь, не задевая белый мутный осадок (лейкоциты) в новую стерильную пробирку типа «Эппендорф». Полученную плазму использовали для выделения фетальной ДНК, остатки отобранной плазмы подвергались заморозке при -23 °С.

Для выделения циркулирующих нуклеиновых кислот плода из плазмы крови использовались три набора реагентов: ДНК- Плазма-М-50 производителя ООО «ТестГен»; ПРОБА-НК-ФЕТ производителя "ООО ДНК-Технология" и QIAamp Circulating Nucleic Acid от производителя «QIAGEN».

Перед началом проведения ПЦР необходимо провести деkontаминацию рабочего места. Используемые ПЦР реагенты оставляют при комнатной температуре до полной разморозки. Перемешивание осуществляется на вортексе, с последующим осаждением капель. В стерильных пробирках объемом 1,5 мл приготавливается реакционная смесь, с последующей закапкой в одноразовые стерильные пробирки типа стрип (на один образец используется 4 лунки). Схема раскапки реагентов указана в методических рекомендациях по применению диагностических наборов по индентификации пола. Проведение лабораторной части ПЦР рекомендуется осуществлять сразу после процедуры выделения фетальной ДНК т.к. данное соединение очень нестабильно и находится в маленьких концентрациях (Инструкция «ТестГен» от 02.07.2020)

Обрабатывались данные за 2020 год, производился анализ полученных результатов. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы Microsoft Excel 2016.

Результаты и обсуждение. Для сравнения методов выделения внеклеточной ДНК плода при определении гена пола (SRY) было исследовано 10 образцов плазмы женщин на 9-10 неделе беременности. Выделение каждого образца производилось тремя разными наборами для выделения внеклеточной ДНК плода: ДНК-Плазма-М-50, производителя ООО «ТестГен» (Россия), ПРОБА-НК-ФЕТ производителя ООО «ДНК-Технология» (Россия) и набор QIAamp Circulating Nucleic Acid от производителя «QIAGEN» (Нидерланды). Для проведения ПЦР использовался набор «Тест-SRY».

Все три используемых нами набора для выделения внеклеточной ДНК показали сходные результаты по следующим показателям: качество очищенной ДНК, времени выделения пробы и время её хранения. Все перечисленные методики хорошо очищают ДНК для дальнейшей амплификации, время выделения примерно ± 4

часа, время хранения 7 суток (хранение при температуре - 4 °С). Однако стоит отметить, выделение фетальной ДНК на спин-колонках и магнитных частицах оказались наиболее предпочтительны для определения пола плода, так как эти методы требуют меньше всего оборудования для их исполнения и более просты в использовании.

При анализе результатов изучения влияния срока беременности на идентификацию гена SRY в фетальной ДНК матери зависимости обнаружено не было. Срок беременности на 9-10 неделях достаточен для определения пола.

Для исследования влияния массы тела матери на выявление гена пола (SRY) проанализированы результаты 217 образцов плазмы крови женщин, у которых был идентифицирован мужской пол плода, при этом нормальную массу тела имели 155 женщин, избыточную - 51 и недостаточную - 11. Расчет индекса массы тела производился по формуле:

Индекс массы тела (ИМТ) = $\frac{m}{h^2}$; где m — масса тела, кг., h — рост, м.

Интерпретация значений: ниже 18,5 – недостаточный вес, от 18,5 до 24,9 – нормально, от 25 – избыточный вес.



Рис. 1. Индекс массы тела человека

Нами не было выявлено различий между результатами по выявлению гена пола (SRY) в образцах плазмы крови женщин с недостаточной, нормальной и избыточной массой тела, т.е. высокий ИМТ (ожирение) не является противопоказанием к проведению исследования по определению пола плода (табл. 1).

Таблица 1

Средние значения пороговых циклов (Ct_{cp}) GAPDH (контроль выделения) и SRY в зависимости от индекса массы

Масса тела (ИМТ)	Пороговый цикл Ct_{cp} ($M \pm m$)	
	GAPDH (контроль выделения)	SRY
Избыточная (более 25)	27,26±2,04	35,64±1,90
Недостаточная (менее 16,5)	27,16±1,38	35,58±1,80
Нормальная (от 18,5 до 25)	27,45±1,41	35,19±2,04

В соответствии со следующей задачей нашего исследования изучено влияние условий транспортировки биологического материала в лабораторию на результат анализа по определению гена SRY в фетальной ДНК плазмы крови беременных женщин.

Проводилось сравнение результатов 310 образцов, забранных в пробирки CPDA (антикоагулянт: натрия цитрат, глюкоза, лимонная кислота, натрия фосфат, декстроза, аденин) с 10 образцами крови, забранных в пробирки Cell-Free DNA BCT Sreck (США) объемом 10 мл. и 29 образцов, транспортировавшихся в пробирках для крови LBgard Biomatrica (США).

Все пробирки имеют разный реагент консервации ДНК (состав этих реагентов коммерческая тайна) и различны по срокам хранения (так, например, кровь в пробирке Sreck может храниться 7 суток, а в пробирке CPDA 2 суток, в Biomatrica – 5 дней). Среди пробирок типа Sreck, в 6 образцах идентифицировалось наличие гена SRY. В 19 образцах, транспортировавшихся в пробирках Biomatrica, определялся ген SRY. В 192 образцах крови, отобранных в пробирки CPDA определяли ген SRY. При анализе сравнивались средние циклы выхода кривых GAPDH как маркер выхода фетальной ДНК. Пробирки типа CPDA показали наилучший результат – количественный размер выхода плазмы больше, чем у других пробирок.



Рис. 2. Вид пробирки типа CPDA

Полученные нами результаты показали, что срок доставки образцов плазмы в течении двух дней с момента забора крови является наиболее оптимальным для анализа по определению пола, так как качество выделяемой ДНК для дальнейшей амплификации лучше.

Заключение. Произведено определение пола плода в 433 образцах плазмы крови женщин, находящихся на 9 по 26 неделях беременности. Ген SRY был идентифицирован в 217 образцах (мужской пол), в 216 образцах ген SRY отсутствовал (женский пол).

Результаты проведённого исследования показали, что выделение фетальной ДНК на спин-колонках и магнитных частицах наиболее предпочтительны для определения пола плода. При использовании пробирок типа CPDA количественный размер выхода плазмы больше, чем у других пробирок. Срок доставки образцов плазмы в течении 2-ух дней является наиболее оптимальным для анализа по определению пола.

Зависимости определения гена SRY от срока беременности и массы тела обследованных женщин обнаружено не было. Т.о. срок беременности на 9-10 неделях и высокий ИМТ не являются противопоказаниями к проведению исследования по определению пола.

Список литературы

- Баклушинская И.Ю.* 2009. Эволюция системы определения пола у млекопитающих // Известия РАН. Серия биологическая. № 2. С. 209-217.
- Баранов В.С., Айламазян Э.К.* 2012. Прикладное и фундаментальное направления пренатальной диагностики // Журнал акушерства и женских болезней. Т. 61. № 3. С. 54-60.
- Баранов В.С., Кузнецова Т.В.* 2015 Новые возможности генетической пренатальной диагностики // Журнал акушерства и женских болезней. Т. 64. № 2. С. 4-12.
- Барков И.Ю.* 2018. Совершенствование системы пренатального скрининга анеуплоидий плода на основе анализа внеклеточной ДНК крови матери: дис... канд. мед. наук.
- Ген RHD* [Электронный ресурс] // Википедия, свободная энциклопедия. Электрон. дан. Сан-Франциско: Фонд Викимедиа, 2019. Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/?curid=8100357&oldid=103866210>
- Ген SRY* [Электронный ресурс] // Википедия, свободная энциклопедия. Электрон. дан. Сан-Франциско: Фонд Викимедиа, 2019. Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/?curid=2077135&oldid=100581568>
- Дезоксирибонуклеиновая кислота* [Электронный ресурс] // Википедия, свободная энциклопедия. Электрон. дан. Сан-Франциско: Фонд Викимедиа, 2021. — Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/?curid=10889&oldid=113369690>
- Инструкция по применению набора реагентов для выявления гена RHD плода в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени «ДНК-Технология».* 2017. У.: ДНК-Технология. 30 с.

DETERMINATION OF THE SEX GENE (SRY) OF A HUMAN FETUS IN THE MOTHER'S BLOOD AFTER 9-10 WEEKS OF PREGNANCY

A.N. Pankrushina, I.A. Kalinicheva, M.N. Reznikova

Tver State University, Tver

Fetal sex was determined in 433 blood plasma samples of women aged 9 to 26 weeks of pregnancy, of which the SRY gene was identified in 217 samples (male), in 216 samples the SRY gene was absent (female sex). Isolating fetal DNA on spin columns and magnetic particles and using CPDA-type test tubes have proven to be most preferred for determining fetal sex. The dependence of the determination of the SRY gene on the duration of pregnancy and body weight of the examined women was not found. The delivery time of plasma samples within 2 days is the most optimal for sex analysis.

Keywords: *non-invasive prenatal diagnosis, fetal DNA, sex gene – SRY.*

Об авторах:

ПАНКРУШИНА Алла Николаевна – доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры зоологии и физиологии, ФГБОУ ВО «Тверской государственной университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 31, e-mail: Pankrushina.AN@tversu.ru.

КАЛИНИЧЕВА Ирина Антоновна – аспирант 2 года обучения, направление «Биохимия», ФГБОУ ВО «Тверской государственной университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33, e-mail: bio.biology@tversu.ru.

РЕЗНИКОВА Марина Николаевна – студентка 2 года обучения направления «Биология», ФГБОУ ВО «Тверской государственной университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 31, e-mail: bio@tversu.ru.

Панкрушина А.Н. Определение гена пола (SRY) плода человека в крови матери после 9-10 недели беременности / А.Н. Панкрушина, И.А. Калиничева, М.Н. Резникова // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2023. № 1(69). С. 27-33.

Дата поступления рукописи в редакцию: 10.11.22

Дата подписания рукописи в печать: 01.03.23