

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И.  
КУЛАКОВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

Екимов Алексей Николаевич

ВОЗМОЖНОСТИ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ  
ТЕХНОЛОГИЙ В ДЕТЕКЦИИ ХРОМОСОМНОЙ И ГЕННОЙ ПАТОЛОГИИ  
ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА.

Специальность 1.5.7. Генетика

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук.

*Научный руководитель:*

д.б.н. Каретникова Н.А.

Москва - 2022 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	15
1.1 Значение преимплантационного генетического тестирования в программах ВРТ .....	15
1.2 Хромосомные аномалии .....	18
1.3 Методы изучения хромосомной патологии.....	19
1.3.1 Цитогенетический анализ .....	19
1.3.2 Применение метода FISH.....	20
1.3.3 Применение метода aCGH .....	23
1.3.4 Применение метода NGS .....	25
1.4 Биоматериал для ПГТ .....	27
1.5 Уровень митохондриальной ДНК (мтДНК) в эмбрионах.....	32
1.6 Хромосомный мозаицизм.....	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	36
2.1 Сравнение результатов, проведенных с помощью aCGH и NGS .....	39
2.1.1 Полногеномная амплификация (MDA) .....	39
2.1.2 Мечение образцов .....	40
2.1.3 Очистка меченых образцов.....	42
2.1.4 Подготовка к гибридизации.....	43
2.1.5 Гибридизация, отмывка и сканирование.....	44
2.1.6 Проведение NGS .....	46
2.2 Изучение особенностей мозаицизма эмбрионов .....	53
2.3 Генотипирование эмбрионов с помощью STR-анализа.....	53

2.3.1	Полногеномная амплификация (PicoPLEX).....	54
2.3.2	Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР).....	55
2.3.3	Выделение ДНК из крови.....	57
2.3.4	Фрагментный анализ.....	58
2.4	SNP-гаплотипирование.....	59
2.5	Определение копийности митохондриальной ДНК в кумулюсе и трофэктодерме эмбрионов .....	60
2.5.1	Определение копийности митохондриальной ДНК с помощью проведения ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени .....	60
2.5.2	Определение копийности митохондриальной ДНК в трофэктодерме эмбрионов .....	61
2.6	Сравнение уровня анеуплоидий эмбрионов у мужчин с различной долей морфологически нормальных сперматозоидов .....	62
2.7	Сравнение уровня анеуплоидий эмбрионов у супружеских пар с фрагментацией ДНК сперматозоидов.....	62
2.8	Статистическая обработка данных.....	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....		65
3.1	Трофэктодерма – основной материал для проведения преимплантационного генетического тестирования.....	65
3.2	Первый российский опыт применения преимплантационных генетических технологий с помощью методов aCGH и NGS .....	66
3.3	Особенности мозаицизма эмбрионов .....	71
3.4	STR-анализ как метод детерминации вклада родителей в генетические нарушения эмбриона.....	79
3.5	SNP-гаплотипирование для преимплантационной диагностики	

моногенной патологии.....	82
3.6 Молекулярно-генетические исследования выявления дополнительных биомаркеров взаимосвязи с частотой анеуплоидий ....	87
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	94
4.1 Определение оптимального материала для преимплантационного тестирования .....	94
4.2 Оценка особенностей применения методов aCGH и NGS для выявления анеуплоидий эмбрионов.....	95
4.3 Оценка влияния мозаицизма при преимплантационном обследовании на полученные результаты .....	97
4.4 Разработка методов определения родительской принадлежности анеуплоидий эмбриона .....	98
4.5 Разработка технологии и алгоритма применения SNP- гаплотипирования для детекции моногенной патологии с использованием чипов Affymetrix.....	99
4.6 Анализ возможности влияния уровней мтДНК в кумулюсных клетках и трофэктодерме на частоту анеуплоидий эмбрионов.....	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	104
ВЫВОДЫ.....	106
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	108
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ .....	109
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	114
Приложение 1. Предлагаемая схема обследования эмбрионов. ....	128
Приложение 2. Пример выдачи заключения на ПГТ-А.....	129
Приложение 3. Пример выдачи заключения на ПГТ-М .....	130

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

До недавнего времени вопрос дородовой диагностики хромосомных и генных заболеваний проводился исключительно на пренатальном этапе. Наиболее распространенным способом диагностики этой патологии является лабораторный анализ тканей плодового происхождения, полученных в I - II триместрах беременности. Однако инвазивные вмешательства не всегда удается выполнить из-за наличия противопоказаний (угроза прерывания, острые заболевания, обострение хронических), они могут осложниться прерыванием беременности. Кроме того, при выявлении патологии плода и последующем прерывании беременности возможны осложнения.

С развитием ВРТ стало возможно и целесообразно проводить такие обследования преимплантационно. Для реализации данной концепции необходимо было внести изменения в порядок применения существующих методик, при необходимости разработать новые, выбрать оптимальный биологический материал для тестирования, оценить эффективность использования различных методических подходов в зависимости от особенностей существующих научных и диагностических лабораторий.

В качестве материала для исследования используют различные биологические образцы, полученные от эмбриона – полярные тельца, бластомеры, образцы трофэктодермы. Выбор оптимального материала для проведения ПГТ является очень важным, так как может влиять на получение правильного результата.

В настоящее время проведение преимплантационного генетического тестирования происходит для выявления хромосомных нарушений у эмбриона (ПГТ-А и ПГТ-СП) и для выявления моногенной патологии (ПГТ-М). Проведение ПГТ-А и ПГТ-СП возможно с помощью различных технологических платформ, позволяющих исследование всего хромосомного набора (полнохромосомные методы). В число наиболее популярных методик, используемых в мире, входят сравнительная геномная гибридизация на чипах (aCGH) и высокопроизводительное секвенирование (NGS), однако единого мнения о преимущественном применении этих методов нет.

Одной из проблем, с которой столкнулись исследователи при проведении ПГТ – хромосомный мозаицизм эмбрионов, при котором разные клетки эмбриона могут иметь различный хромосомный состав. Изучение этого феномена имеет важнейшее значение для правильной интерпретации получаемых данных и для адекватного консультирования пациентов по перспективам данного эмбриона в случае его переноса в полость матки.

Преимплантационное выявление моногенной патологии в эмбрионах до сих пор является сложной задачей, что связано с необходимостью как прямой диагностики искомых мутаций, так и косвенной диагностики для подтверждения полученных результатов. Поиск и разработка новых методических подходов для преимплантационной детекции моногенной патологии на сегодняшний день является актуальным.

Вызывают повышенный интерес молекулярно-генетические подходы, позволяющие определить вклад других кроме хромосомной патологии факторов, влияющих на развитие эмбрионов. Так перспективно выглядит исследование уровней митохондриальной ДНК в эмбрионах с целью прогнозирования их репродуктивного потенциала. Однако данных, посвященных этой теме до сих пор не много.

Кроме того, не следует забывать про то, что на развитие эмбрионов

кроме биологических факторов со стороны матери могут влиять и биологические характеристики отца. Одним из таких факторов является качество сперматозоидов, в том числе и морфологические характеристики, количество и фрагментация ДНК. Изучение этих факторов позволит оптимизировать показания к проведению ПГТ.

### **Цель исследования**

Целью настоящего исследования явилось: оптимизация и разработка методов преимплантационного генетического тестирования эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

### **Задачи исследования:**

1. Определить материал, оптимальный для преимплантационного тестирования.
2. Сравнить результаты применения aCGH и NGS анализов в выявлении хромосомной патологии эмбрионов.
3. Изучить возможности использования современных молекулярно-генетических технологий для обнаружения мозаицизма эмбриона.
4. Разработать метод определения родительской принадлежности анеуплоидий эмбриона.
5. Разработать методику SNP –гаплотипирования для детекции

моногенной патологии с помощью хромосомного микроматричного анализа.

6. Изучить уровень копийности мтДНК в кумулюсных клетках и трофэктодерме у эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов.
7. Исследовать кариотип эмбриона в зависимости от уровня фрагментации ДНК сперматозоидов.
8. Оптимизировать схему обследования эмбрионов с учетом полученных данных.

### **Научная новизна**

Впервые в России проведен перенос эмбриона в полость матки после преимплантационного генетического тестирования методом аCGH (Agilent, США).

Впервые в России в качестве преимплантационного генетического скрининга проведена оценка возможностей использования методов NGS и аCGH.

Разработана методика проведения фрагментного STR-анализа с использованием различных продуктов полногеномной амплификации для генотипирования эмбрионов. Одновременно с генотипированием эмбрионов можно осуществлять преимплантационное генетическое тестирование и анеуплоидий, и моногенной патологии без необходимости повторного забора материала для исследования.

Разработан метод гаплотипирования для ПГТ-М, основанный на анализе однонуклеотидных полиморфизмов с использованием микрочипов высокого разрешения Affymetrix CytoScan 750K. Определено, что на результаты SNP-

гаплотипирования оказывает влияние метод полногеномной амплификации: приоритет MDA по сравнению с WGA-PCR. Интерпретация результатов SNP-гаплотипирования не требует индивидуальной разработки для каждого случая и является универсальной.

Обнаружено, что анеуплоидии в эмбрионах ассоциированы с повышенным уровнем мтДНК, что может быть обусловлено или клеточным стрессом с потреблением дополнительной энергии, или развитием компенсаторного механизма, вследствие нарушения функционирования митохондрий из-за накопления мутаций в митохондриальном геноме. Изменение количества мтДНК может влиять на точность сегрегации хромосом.

Выявлено повышения частоты анеуплоидий у эмбрионов при снижении морфологически нормальных форм сперматозоидов, увеличении уровня фрагментации ДНК сперматозоидов, что свидетельствует о вкладе повреждений структуры ДНК сперматозоидов в генетический материал эмбриона.

### **Достоверность и обоснованность научных результатов**

Степень достоверности и обоснованности научных результатов определяется достаточным количеством исследованных образцов (3691 эмбрион, 448 супружеских пар, 454 ооцит-кумулюсных комплекса), современными методами исследования и верификации полученных результатов, корректными методами статистической обработки.

### **Практическая значимость работы.**

В результате исследования определены оптимальные материал и методы ПГТ в программах ВРТ.

Установлена возможность обнаружения мозаицизма и происхождения анеуплоидии у эмбриона – от матери или отца, что имеет значение при подготовке к использованию гамет донора.

Разработан оптимальный подход к тестированию моногенной патологии.

Данные, полученные о взаимосвязи между уровнями мтДНК в трофэктодерме blastocисты и клетках кумулюса, фрагментацией ДНК сперматозоидов с частотой аномальных кариотипов эмбрионов, следует учитывать в схемах подготовки к ВРТ.

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Трофэктодерма blastocисты является оптимальным материалом ПГТ, для исследования которой методом выбора является NGS с применением MDA амплификации. Такой подход позволяет осуществить тестирование анеуплоидий, определить наличие мозаицизма, что влияет на выбор эмбриона, подлежащего переносу в программах ВРТ.

2. Разработаны методы фрагментного STR-анализа, SNP-гаплотипирования. С их помощью возможно установить родительскую принадлежность хромосом анеуплоидных эмбрионов, осуществить

оптимальный подбор донорских гамет, выявить наследование мутантных аллелей в эмбрионах.

3. Установлена взаимосвязь частоты анеуплоидных эмбрионов с копийностью ДНК в трофэктодерме бластоцист и в клетках кумулюса, количеством морфологически нормальных сперматозоидов, уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов, что следует учитывать при обследовании для подготовки к ВРТ.

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты исследования одобрены Ученым Советом ФГБУ «НМИЦ А.Г.П им. В.И. Кулакова» Минздрава России и внедрены в практическую работу Института репродуктивной генетики и Института репродуктивной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также внедрены в практическую деятельность Российско-немецкого центра репродукции и клинической эмбриологии ООО "Поколение НЕКСТ".

### **Апробация работы**

Результаты работы были представлены и обсуждены на 16 российских и 6 международных конференциях: XIV Всероссийский научный форум «Мать

и дитя» (Москва, 24–27 сентября 2013), Медицинские и социальные проблемы орфанных болезней: диагностика, лечение, профилактика. (Томск, 27–28 февраля 2014), VI Международный конгресс «Современные подходы к лечению бесплодия. ВРТ: настоящее и будущее. (Алматы, Казахстан, 7–8 ноября 2014), Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS) Annual Meeting (Великобритания, Кентербери, 29 апреля – 2 мая 2014), «Современные молекулярно-биологические и генетические технологии в медицинской практике» (Новосибирск, 25 февраля 2014), Всероссийская научно-практическая конференция по геномному секвенированию (Москва, 14 мая 2015), ESHRE 2015 Annual meeting, (Лиссабон, Португалия, 14-17 июня 2015), XXV Юбилейная конференция РАРЧ "Репродуктивные технологии сегодня и завтра" (Сочи, 9 - 12 сентября 2015), Совместное заседание СПб регионального отделения Российской Ассоциации Репродукции Человека (РАРЧ) СПб регионального отделения Российского Общества Медицинских Генетиков (РОМГ) «ЭКО для ПГД и ПГД для ЭКО» (Санкт-Петербург, 26 мая 2016 г), VIII международный конгресс КАРМ «Современные подходы к лечению бесплодия. ВРТ: настоящее и будущее» (Алматы, Казахстан, 4-5 ноября 2016), IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (Москва, 18-20 апреля 2017), Третья международная научно-практическая конференция «NGS в медицинской генетике» (Суздаль, 25-27 апреля 2018), II Международная школа по репродуктивной генетике (Москва, 12-14 декабря 2018), Научно-практическая конференция «Преимплантационное генетическое тестирование в клинической практике: дискуссионные вопросы и ближайшее будущее» (Москва, 15 декабря 2018), Международный научный конгресс «Генетика XXI века» (Москва, 26-28 мая 2019), Научно-практический семинар «Развитие и стандартизация методов преимплантационного генетического тестирования» (Санкт-Петербург, 19 октября 2019), Научно-практическая конференция «Сложный пациент: неординарные решения» (Москва, 13-14 декабря 2019),

XV Ovarian Club meeting (Гонконг, 14–15 декабря 2019), 35th Annual Meeting of the ESHRE (Вена, Австрия, 24-26 июня 2019), XX Юбилейный Всероссийский научно-образовательный форум «Мать и Дитя» (Москва, 25-27 сентября 2019), XXX ежегодная международная конференция РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (Москва, 8-12 сентября 2020), XXI Всероссийский научно-образовательный форум "Мать и Дитя - 2020" (Москва 28–30 сентября 2020 года).

Апробация диссертации состоялась на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ А.Г.П им. В.И.Кулакова» Минздрава России 18 апреля 2022 года, протокол №2.

### **Публикации.**

По теме диссертации опубликовано 35 печатных работ, из них 4 публикации в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 20 статей в рецензируемых научных журналах из списка Scopus, опубликовано 11 тезисов докладов в сборниках конференций, включенных в РИНЦ.

### **Личный вклад автора.**

Автор проводил сбор и анализ информации из литературных источников

по теме диссертации. Дизайн и программа исследования проводились автором лично и были согласованы с научным руководителем. Методическая часть работы (проведение полногеномной амплификации, aCGH, ПЦР, баркодирование продуктов амплификации для последующего NGS) проводились автором собственноручно. Автор лично осуществлял анализ и статистическую обработку полученных данных, интерпретацию результатов aCGH, NGS, ПЦР, фрагментного анализа.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 131 странице печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 13 рисунками, содержит 3 приложения. Указатель литературы содержит 107 библиографических источников, в том числе 17 отечественных публикаций.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Значение преимплантационного генетического тестирования в программах ВРТ

Эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) во многом зависит от качества переносимых эмбрионов и их имплантационного потенциала. Современные методы генетической диагностики позволяют составить «генетический паспорт» эмбриона и избежать переноса в полость матки эмбрионов, имеющих генетические нарушения [19, 53, 74, 100]. Установлено, что около 25% ооцитов, полученных от женщин в возрасте 30 лет, содержат хромосомные аномалии, при этом частота анеуплоидии в ооцитах напрямую зависит от возраста и может достигать 80% у женщин старше 40 лет [37]. Необходимость отбора эмбрионов с нормальным набором хромосом послужила развитием нового диагностического направления - преимплантационной генетической диагностики (ПГД), в настоящее время получившего название преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ).

Для значительного числа женщин возможность самостоятельной беременности и вынашивания плода в ряде случаев затруднена или вообще невозможна. Это может быть связано с их анатомическими, физиологическими особенностями, сопутствующими заболеваниями, а также с соответствующими особенностями их половых партнеров. Для реализации их репродуктивной функции им приходится обращаться к помощи врачей-репродуктологов, использующих в своей практике вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ).

Центральное место в программах ВРТ занимает экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО). Данная процедура заключается в оплодотворении половых клеток женщины сперматозоидом мужчины *in vitro*, культивировании полученного эмбриона и, при достижении им определенной стадии развития, в переносе в полость матки пациентки. Такой подход, медицинские показания к которому строго регламентированы, зачастую может помочь пациенткам, у которых не получается забеременеть естественным способом.

Для получения половых клеток у женщин применяется процедура стимуляции, которая заключается в назначении им гормональных препаратов, увеличивающих количество одновременно созревающих яйцеклеток, которые возможно в дальнейшем получить у них с помощью процедуры пункции яйцеклеток.

Для получения половых клеток у мужчин в большинстве случаев используют их эякулят, однако в ряде случаев приходится проводить процедуру пункции яичек для поиска в полученном биоматериале сперматозоидов с наибольшим репродуктивным потенциалом.

Все описанные выше подходы связаны с неоднократными визитами к врачу, лабораторными исследованиями, приемом лекарственных препаратов, хирургическими манипуляциями. Если программа ЭКО не оплачивается из средств Фонда ОМС, то при использовании данных программ пациенты также несут и значительную финансовую нагрузку на семейный бюджет.

Вместе с тем эффективность программ ВРТ (то есть вероятность родить ребенка в данной программе) является не высокой. В среднем такая эффективность составляет порядка 30%. Во всем мире предпринимались и предпринимаются попытки увеличить эффективность ВРТ, чтобы для рождения ребенка женщине пришлось пройти минимальное количество таких программ.

Накопленный на сегодня опыт свидетельствует о том, что одним из наиболее важных факторов, влияющих на вероятность рождения ребенка как в программах ВРТ, так и самостоятельно, является возрастной фактор. Чем старше женщина, тем ниже у нее вероятность рождения ребенка. Вместе с тем увеличивается частота репродуктивных потерь и вероятность рождения ребенка с хромосомными патологиями (прежде всего синдром Дауна, связанный с трисомией 21 хромосомы) [60].

Согласно опубликованным данным кариотипирования абортусов примерно половина из них несет хромосомные нарушения, связанные с изменением нормального числа хромосом в их геноме (то есть с анеуплоидиями) [80].

Таким образом, очевидно, что если в геноме эмбриона человека содержатся анеуплоидии, то перенос такого эмбриона в полость матки пациентки не приведет к рождению здорового ребенка, а в случае наступления беременности приведет к прерыванию беременности или рождению ребенка с хромосомной патологией.

Было высказано предположение, что анализ генома эмбрионов перед их имплантацией с переносом эмбрионов без анеуплоидий способен увеличить эффективность программ ВРТ [69, 96].

Данное предположение явилось предпосылкой развития такой важной области репродуктивной генетики, как преимплантационная генетическая диагностика.

В этой работе описаны результаты внедрения данной технологии в клиническую практику ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ.

## 1.2 Хромосомные аномалии

Нормальный генотип человека состоит из 23 пар хромосом. Такой полный сбалансированный геном содержит все необходимые гены, необходимые для развития плода и ребенка, а также для полноценной жизнедеятельности организма.

Отсутствие одной из хромосом у плода (моносомия) как правило приводит к выкидышам во время беременности в связи с развитием из-за этого не совместимых с жизнью нарушений. Очень редко возможно рождение детей с таким не полным геномом, однако, как правило такие дети очень рано погибают.

Присутствие же лишней хромосомы в геноме человека (трисомия) тоже как правило приводит к выкидышам во время беременности. Однако существует ряд синдромов, связанных с трисомиями 21, 13 и 18, которые наблюдаются у детей и даже взрослых (синдром Дауна, трисомия 21). И если при синдроме Патау (трисомия 13) и при синдроме Эдвардса (трисомия 21) дети погибают в первый год жизни, то в случае синдрома Дауна срок жизни таких людей при адекватном уходе и лечении сопутствующих патологий исчисляется десятилетиями. Тем не менее синдром Дауна сопровождается задержкой умственного и речевого развития, у таких пациентов зачастую выявляются врожденные пороки сердца, катаракта, зубные аномалии и другие патологии, существенно ухудшающие качество их жизни.

Анеуплоидии по половым хромосомам (X и Y) в ряде случаев могут не иметь выраженных клинических проявлений у детей и взрослых. Иногда о наличии таких хромосомных нарушений пациенты узнают уже в зрелом возрасте при прохождении кариотипирования. Тем не менее, анеуплоидии по

половым хромосомам, такие как синдромы Кляйнфельтера и Шерешевского-Тернера, в подавляющем большинстве случаев приводят к бесплодию.

К числу хромосомных аномалий, которые могут приводить к развитию вышеописанных синдромов, относятся также делеции, дупликации (в том числе и связанные с транслокациями) значительных по своей протяженности участков генома соответствующих хромосом. Подобные нарушения носят название частичных анеуплоидий.

Случается, что клетки пациента могут иметь разный хромосомный набор (клеточный мозаицизм). Например, половина клеток с нормальным кариотипом, а половина с трисомией 21. В таком случае также возможно развитие синдрома Дауна, однако выраженность его клинических проявлений будет меньше. Чем меньше доля клеток с аномальным генотипом у пациента, тем меньше будет выраженность клинических проявлений соответствующего синдрома.

## **1.3 Методы изучения хромосомной патологии**

### **1.3.1 Цитогенетический анализ**

Золотым стандартом изучения хромосомного набора человека является цитогенетический анализ. Данный метод заключается в исследовании хромосомного аппарата клеток под микроскопом после соответствующей обработки, фиксации и окрашивания.

В связи с тем, что каждая хромосома имеет свой собственный

индивидуальный паттерн окрашивания, существует возможность посчитать и идентифицировать каждую хромосому в исследуемых клетках. Более того, в зависимости от применяемой методики, возможно идентифицировать также крупные делеции и дупликации. Уникальность цитогенетического метода также и в том, что есть возможность прямой диагностики транслокаций у данного пациента. Однако возможность диагностики транслокаций зависит от их размера и не представляется возможной при субмикроскопических перестройках.

Для проведения данного анализа подходят не всякие клетки. Чтобы идентифицировать и подсчитать хромосомы необходимо, чтобы клетка находилась в стадии митоза, когда происходит удвоение хромосом и их конденсация. Для этого клетки должны быть живыми, их необходимо культивировать, синхронизировать и останавливать деление в определенный момент. Это накладывает известные ограничения на применение данной методики. В частности, цитогенетический метод с целью проведения ПГТ нельзя применять на бластомерах или клетках трофэктодермы эмбрионов.

### **1.3.2 Применение метода FISH**

Первым методом, который был применен для тестирования анеуплоидий у эмбрионов, был метод флуоресцентной гибридизации *in situ* - fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Данный метод заключается в том, что исследуемые клетки фиксируются на подложке, лизируются и с подложки отмывается все, кроме хромосом. После чего к этому препарату добавляют специальные ДНК-зонды, меченые с помощью флуоресцентных красителей. Эти зонды представляют собой молекулы ДНК, последовательность которых

комплементарна интересующему исследователя участку хромосомы. Таким образом, при изучении препарата с помощью флуоресцентного микроскопа можно обнаружить зоны свечения, которые характеризуют тот или иной участок хромосомы [70].

Для проведения FISH нет необходимости предварительного культивирования клеток, их синхронизации и остановки деления, не обязательно, чтобы клетка находилась на стадии митоза. Соответственно данный метод подходит для изучения хромосомного аппарата бластомеров и клеток трофэктодермы эмбрионов [69].

Одним из преимуществ данного метода по сравнению с кариотипированием является то, что возможно изучение наличия микродупликаций и микроделений (за пределами разрешающей способности цитогенетического метода) путем использования соответствующих флуоресцентных зондов. Необходимо отметить, что этот метод не подходит для поиска таких хромосомных мутаций, а используется для подтверждения наличия или отсутствия таковых [72].

На эмбрионах человека первые эксперименты по ПГД проводились для определения пола плода с целью исключения рождения ребенка с генетическими заболеваниями, сцепленными с полом [95], однако в последующем FISH стали использовать для выявления анеуплоидий в аутосомах, и в первую очередь в хромосомах 13, 18 и 21 [69, 96].

В клинической практике ФГБУ НЦА.Г.иП им. В.И.Кулакова было показано, что в старшей возрастной группе пациенток (после 35 лет) повышается не только количество трисомий по 13, 18, 21 хромосомам и численных нарушений по половым хромосомам X и Y, но почти в 1,5 раза, увеличивается число триплоидий [10].

Однако, как показали крупные рандомизированные клинические

исследования (РКИ), данный метод не позволяет существенно повысить результативность ВРТ [66]. Скорее всего это связано с тем, что количество флуорофоров, надежно дискриминируемых с помощью флуоресцентной микроскопии в рамках одного эксперимента ограничено техническими возможностями оборудования. В связи с этим количество исследуемых зондов в рамках одного исследования, как правило, ограничено 5–7. Для проведения FISH в основном используют зонды на хромосомы 13, 18, 21, X и Y. Данный набор зондов удобно и целесообразно использовать для пренатальной диагностики, так как с их помощью можно провести диагностику таких синдромов, как синдром Патау, Эдвардса, Дауна, Кляйнфельтера, Шерешевского-Тернера. Вместе с тем для преимплантационного тестирования обследования лишь ограниченного числа хромосом недостаточно. Метод не позволяет провести полнохромосомное тестирование, кроме того, результаты тестирования одного blastomera не могут давать объективное представление о целом эмбрионе по причине высокого уровня мозаичности эмбрионов на данной стадии развития [94].

Анеуплоидии могут возникать в любых хромосомах, и исследование ограниченного числа хромосом может приводить к ложноотрицательным результатам тестирования. Были разработаны методики, позволяющие проводить исследование все большего и большего числа хромосом в исследуемых blastomeraх. Тем не менее они не получили широкого распространения из-за своей трудоемкости и высокой цены [93]. Более того, стало очевидно, что FISH является субъективной методикой, результаты которой очень сильно зависят от квалификации проводящих исследования сотрудников. Результаты клинической эффективности FISH для преимплантационного генетического скрининга в разных клиниках могли кардинально различаться [50]. Поэтому были продолжены работы по поиску более надежных и информативных методов выявления хромосомной патологии у эмбрионов.

### 1.3.3 Применение метода aCGH

Метод сравнительной геномной гибридизации (СГГ) впервые был предложен в 1992 году для молекулярно-цитогенетического анализа солидных опухолей. Метод заключается в нанесении препарата исследуемых хромосом на предварительно иммобилизованные на стеклянной подложке метафазные пластинки референсного генома [56].

В качестве исследуемого образца также можно использовать не только геномную ДНК, но и продукт полногеномной амплификации ДНК из единичных клеток. Это сделало возможным внедрение данного подхода для проведения ПГС на бластомерах, полярных тельцах и трофэктодерме [36].

Использование метода СГГ показало свою эффективность для проведения ПГТ, однако, как и в случае использования FISH, методика являлась трудоемкой и все еще субъективной [38].

В настоящее время для скрининга анеуплоидий используют технологии, которые позволяют провести полный хромосомный скрининг эмбриона. К таким методам относят сравнительную геномную гибридизацию на «биологических чипах» - microarray comparative genomic hybridization (array-CGH) [6, 52], а также так называемый микроматричный анализ с помощью однонуклеотидных полиморфизмов - single nucleotide polymorphism (SNP array) [91].

Технология array-CGH стала первой широкодоступной технологией для полнохромосомного анализа. В данном методе исследуемая и референсная ДНК гибридизуются на ДНК-зондах, представляющих собой относительно короткие фрагменты генома изучаемого организма. В настоящее время сравнительная геномная гибридизация (array-CGH) является надежным методом определения молекулярного кариотипа эмбрионов и широко

используется в клиниках репродукции [1, 2, 8, 13, 14, 16, 31, 34, 44, 46, 51, 79, 104]. Преимуществом метода array-CGH по сравнению с FISH является способность выявлять как микроскопические хромосомные нарушения (анеуплоидии, в том числе и мозаицизм, несбалансированные транслокации и маркерные хромосомы), так и субмикроскопические (микроделеционные/микродупликационные синдромы, несбалансированные субтеломерные перестройки) одномоментно во всем геноме [2, 38]. Однако данный метод не позволяет выявлять сбалансированные перестройки (реципрокные транслокации, инверсии, робертсоновские транслокации, реципрокные инсерции) и ряд несбалансированных перестроек (перестройки за границей разрешения, точечные мутации, тринуклеотидные экспансии, делеции и дупликации ниже границы чувствительности).

Одновременно с методом array-CGH в практику внедрен метод SNP array (хромосомный микроматричный анализ с использованием однонуклеотидных полиморфизмов), с помощью которого также возможно исследовать структуру всего генома в одном исследовании. Однако, кроме этого, применение данного подхода позволяет не только определить наличие хромосомного дисбаланса, но и выявить его происхождение – материнское или отцовское [90]. Подобная методика прежде всего нашла свое применение при тестировании эмбрионов у пар, в которых один или оба супруга являются носителями хромосомных транслокаций [54, 103]. Вместе с тем по сравнению с «обычной» сравнительной геномной гибридизацией на биологических чипах данная методика является более трудоемкой и дорогостоящей, и по этой причине, применяющейся значительно реже.

### 1.3.4 Применение метода NGS

Несмотря на то, что метод aCGH зарекомендовал себя как надежный, удобный и информативный, его себестоимость все еще остается высокой. В 2010 для проведения преимплантационного генетического тестирования анеуплоидий было предложено использовать метод высокопроизводительного секвенирования — next-generation sequencing (NGS) [49]. Существенными преимуществами подхода являются гибкая глубина исследования (в зависимости от количества прочтений на образец можно менять разрешение - от анеуплоидий до небольших инсерций/делеций), скорость получения результата (некоторые платформы позволяют выдать ответ за 1–2 рабочих дня). Высокая процессивность метода позволяющая в один запуск проводить исследование нескольких десятков образцов, а также меньшая стоимость анализа по сравнению с array-CGH (при больших загрузках приборов) привели к тому, что данный метод вытесняет метод сравнительной геномной гибридизации на биологических чипах в области преимплантационного генетического тестирования [88].

После рождения первого ребенка в программе ВРТ с применением NGS в 2013 году в Филадельфии несколько крупнейших генетических лабораторий мира сообщили о проведенных доклинических исследованиях и показали, что NGS - точный и надежный метод диагностики [32, 33]. Результаты исследования установили 100% совпадение методов NGS и array-CGH при выявлении анеуплоидий эмбрионов. Современные исследования также демонстрируют высокую сходимость результатов aCGH и NGS [11]

Имеющиеся на сегодняшний день сведения о клинической эффективности данного подхода демонстрируют его высокую эффективность. Фактически данный подход в настоящее время является наиболее распространенным [17, 99].

Недостатками высокопроизводительного секвенирования являются трудоемкость и многоэтапность процесса секвенирования, высокую стоимость лабораторного оборудования.

Для анализа получаемых данных необходимо привлечение высококвалифицированного специалиста - биоинформатика, так как специалист исключительно с медицинским или биологическим образованием не в состоянии самостоятельно провести весь анализ данных самостоятельно. Но в последнее время появляется все больше программного обеспечения, рассчитанного на обычного пользователя (медика или биолога), и работающего по принципу «нажми на кнопку» - то есть пользователь указывает путь к данным, которые хочет проанализировать, а на выходе получает готовый отчет о генетическом статусе эмбриона.

С точки зрения информативности получаемых данных можно утверждать, что и гибридизационные технологии, и высокопроизводительное секвенирование позволяют получить одинаковый объем информации о хромосомном статусе исследуемых эмбрионов, то есть о наличии или отсутствии у них анеуплоидий. Выбор метода исследования анеуплоидий в эмбрионах в конкретной клинике или лаборатории должен также основываться на информации о количестве обследуемых пациентов, так как высокопроизводительное секвенирование способно конкурировать со сравнительной геномной гибридизацией лишь тогда, когда есть значительное число эмбрионов, подлежащих обследованию. В противном случае для анализа не большого числа биологических образцов целесообразнее использовать сравнительную геномную гибридизацию на чипах.

## 1.4 Биоматериал для ПГТ

Одним из важнейших вопросов при проведении ПГТ на анеуплоидии у эмбриона является тип исследуемого биологического материала. для проведения. В качестве исследуемого материала используется ДНК:

- единичных бластомеров эмбриона на стадии дробления;
- полярных телец (первого и/или второго) от яйцеклетки или зиготы;
- клеток трофэктодермы на стадии бластоцисты.

На заре преимплантационного генетического тестирования в качестве исследуемого материала использовались полярные тельца. В ходе женского гаметогенеза и созревания яйцеклетки при образовании соответствующих гамет "лишняя" генетическая информация элиминируется из яйцеклетки и образует первое и второе полярные тельца. Биопсия полярного тельца может дать информацию о генетических нарушениях только в генах и хромосомах, полученных от матери. Кроме того, данная информация является косвенной и наличие или отсутствие анеуплоидий в полярных тельцах не может гарантировать аналогичную картину в самой зиготе [81, 97]. Процедура биопсии полярного тельца считается малоинвазивной, кроме того, проводится манипуляция не с эмбрионом, а с яйцеклеткой, что может иметь важное значения с точки зрения деонтологии и соответствующего законодательства в разных странах. Так, например, в Германии до недавнего времени были запрещены любые манипуляции с эмбрионами, в том числе и с целью проведения преимплантационного генетического тестирования.

Опыт многих центров, использующих для ПГТ ДНК первого и второго полярных телец ооцитов, показал, что данный обладает рядом преимуществ по сравнению с биопсией эмбриона на стадии дробления [34]

Во-первых, отсутствует хромосомная мозаичность, характерная для дробящихся эмбрионов, во-вторых, процедура отличается минимальной инвазивностью, так как для исследования забирается материал, который в дальнейшем не будет участвовать в развитии эмбриона. Однако у метода отмечены и некоторые недостатки, такие как трудоемкость забора материала (необходимо провести биопсию обоих полярных телец у всех полученных ооцитов пациентки) и возможность проанализировать только материнский геном, а не геном всего эмбриона. Данный подход не учитывает возможный вклад отцовского генома и любые анеуплоидии, возникающие в ходе митотического деления клеток эмбриона [34, 45].

Европейское общество репродукции человека и эмбриологии (ESHRE) провело анализ, который показал, что не всегда анеуплоидии, выявленные в первом и/или втором полярном тельце, приводят к хромосомным перестройкам зигот [45]. Таким образом, при использовании полярных телец в качестве материала для ПГТ возникает проблема: проводить ли дальнейшее культивирование ооцитов с анеуплоидиями полярных телец?

Биопсия клеток трофэктодермы позволяет анализировать несколько клеток [67]. Помимо высокой диагностической ценности, данный метод позволяет сохранить целостность внутриклеточной массы, из которой в дальнейшем развивается эмбрион. Однако открытыми остаются вопросы времени проведения биопсии и объема биологического материала [22, 24, 106]. Результаты, полученные при биопсии трофэктодермы, могут отличаться от результатов при биопсии эмбрионов на стадии деления или бластоцисты, так как в последнем случае не исключено присутствие мозаичных клеток [73].

Эмбрион образуется после оплодотворения яйцеклетки сперматозоидом. В последующем после последовательных делений к третьим суткам развития эмбрион состоит примерно из 8 клеток, называемых бластомерами. На этой стадии развития эмбриона с помощью

микроманипуляций эмбриологи способны провести биопсию одного из бластомеров эмбриона для проведения генетического анализа. Данная процедура не сильно влияет на жизнеспособность эмбриона, однако является более информативной по сравнению с биопсией полярных телец, так как позволяет выявить анеуплоидии не только материнского мейотического происхождения, но и влияние митотических ошибок как с участием материнских, так и отцовских хромосом [24, 81]. До недавнего времени чаще всего ПГТ проводился именно на материале биопсии эмбрионов третьего дня культивирования *in vitro* [47, 71]. Однако целесообразность такого подхода оспаривается тем фактом, что стадия дробления у эмбрионов характеризуется высоким уровнем мозаицизма – до 45% [99]. Последние исследования показали, что повторная биопсия эмбрионов, проведенная на пятый или шестой день культивирования, подтверждает наличие анеуплоидии, выявленной на 3 сутки развития [82, 92].

На четвертые сутки образуется морула, представляющая из себя довольно рыхлую массу из клеток меньшего чем бластомеры размера, и примерно на пятые-шестые сутки развития эмбрион становится бластоцистой с определенной структурой.

Часть клеток составляют внутреннюю клеточную массу. Эти клетки в дальнейшем разовьются в человеческий организм. Другие клетки формируют вокруг внутренней клеточной массы шаровидную структуру – трофэктодерму. В дальнейшем после имплантации эмбриона в слизистую матки трофэктодерма сформирует хорион и плаценту.

На стадии бластоцисты также можно проводить биопсию клеток эмбриона, и данный подход имеет ряд неоспоримых преимуществ. Во-первых, доказано, что проведение биопсии трофэктодермы наносит эмбрионам меньший возможный вред, чем проведение биопсии бластомеров [18, 64]. Во-вторых, биопсия трофэктодермы в отличие от биопсии бластомеров

подразумевает забор сразу нескольких клеток (3-5 штук) что увеличивает надежность проведения дальнейших генетических тестов, а также делает возможным изучение такого важного биологического явления, как мозаицизм [23, 84]. В-третьих, немаловажно, что ряд эмбрионов останавливается в развитии до пятых суток, следовательно, проведение им преимплантационного генетического тестирования является нерациональным и ведет к неэффективному расходованию времени и средств как пациента, так и в лаборатории.

Широкое распространение процедура биопсии трофэктодермы с целью проведения преимплантационного генетического тестирования получила после успешного внедрения методики витрификации эмбрионов, когда стало возможным проводить криоконсервацию и, главное, разморозку эмбрионов на стадии бластоцисты с высокой эффективностью. Таким образом для проведения ПГТ стала возможна схема, когда проводится культивирование эмбрионов до пятых суток развития, биопсия трофэктодермы и витрификация эмбрионов. Биоптат трофэктодермы становится субстратом проведения преимплантационного генетического тестирования, и в случае ее успешного завершения соответствующий эмбрион размораживают и переносят в полость матки пациентки [26].

Использование в качестве объекта исследования бластомеров у эмбрионов 3-х суток развития накладывало свой отпечаток на используемые для проведения ПГТ технологии. Результаты исследования необходимо было предоставить за 1-2 суток, чтобы успеть провести перенос эмбриона на 5-6 сутки развития в свежем цикле.

Применение технологии биопсии полярных телец несколько упростило задачу, так как для проведения исследования время увеличивалось на 2-3 суток, однако, как и отмечалось выше, эта технология сопряжена с известными ограничениями.

Внедрение в 2005 году технологии витрификации эмбрионов позволило проводить забор биоматериала не на 3 сутки развития эмбриона, когда есть возможность забрать только один бластомер, а на 5 сутки развития, когда эмбрион достигает стадии бластоцисты [59]. На этой стадии эмбриона существует возможность забора сразу нескольких (чаще от 3 до 5, реже до 10) клеток трофэктодермы. Во-первых, это позволяет увеличить надежность анализа, так как вероятность амплификации ДНК нескольких клеток трофэктодермы выше, чем у единичного бластомера, что снижает число отрицательных результатов тестирования из-за не прошедшей амплификации. Во-вторых, биопсия трофэктодермы является более щадящей процедурой для эмбрионов и наносит им минимальный ущерб по сравнению с биопсией бластомеров [83]. В-третьих, работа сразу с несколькими клетками снижает влияние хромосомного мозаицизма на результаты ПГС и, таким образом, может снизить долю эмбрионов, не рекомендованных для переноса.

После проведения процедуры биопсии трофэктодермы происходит криоконсервация эмбриона. Таким образом, время, необходимое для проведения всех необходимых генетических анализов уже может достигать не несколько суток, а быть теоретически неограниченно долгим. Это позволяет проводить преимплантационное генетическое тестирование ровно столько, сколько надо для получения надежных результатов.

У каждого из представленных подходов к изучению хромосомного статуса эмбрионов есть как преимущества, так и недостатки. Для решения вопроса о целесообразности применения того или иного вида биопсии необходимо также учитывать технические возможности эмбриологических лабораторий и квалификацию исполнителей.

Сравнительно новым подходом к изучению хромосомного состава эмбрионов является исследование жидкости из полости бластоцисты (бластоцеле) и среды культивирования. Считается, что преимуществом

подобного не инвазивного подхода является минимальный риск для развития эмбриона в связи с его атравматичностью. Однако в связи с техническими сложностями этот подход пока не получил широкого распространения и остается экспериментальным [5, 12].

### **1.5 Уровень митохондриальной ДНК (мтДНК) в эмбрионах**

Кроме геномной ДНК клетки человека, в том числе и эмбриональные, содержат митохондриальную ДНК, входящую в состав митохондрий. Митохондрии являются органеллами, отвечающими за энергетическое снабжение клетки. В ходе процесса окисления органических соединений, поступающих в клетку, в митохондриях происходит синтез АТФ, являющейся универсальным источником энергии для биохимических процессов, происходящих в клетках.

Количество копий мтДНК сильно отличается не только в клетках живых организмов разных видов, но даже в пределах клеток одного организма и не является постоянной величиной, то есть в ходе жизнедеятельности клетки количество ее мтДНК может меняться. [43, 57, 68, 85]

В связи с тем, что применение преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии несмотря на ожидаемые успехи не дало значительного увеличения частоты наступления беременности, хотя и оказалось способным эффективно снизить число анеуплоидий в эмбрионах и предотвращать рождение детей с хромосомными болезнями, был продолжен поиск маркеров, которые бы помогли в выборе эмбрионов с наилучшим репродуктивным потенциалом [87, 89].

Вышеуказанные свойства мтДНК позволили сделать предположение, что измерение ее уровня у эмбрионов возможно будет являться одним из маркеров их «качества», то есть способности к имплантации, развитию и в дальнейшем к рождению здорового ребенка [40, 42]

Первые исследования уровня мтДНК в эмбрионах проводились методом ПЦР в реальном времени путем сравнения амплификации геномной и митохондриальной ДНК в исследуемом образце. Полученные результаты свидетельствовали, что уровень мтДНК может являться искомым маркером [87, 89]. Однако дальнейшие исследования продемонстрировали противоречивые результаты. Так, в исследовании Diez-Juan A, 2015 авторы сделали заключение, что повышенное количество мтДНК в эуплоидных эмбрионах связано с плохим потенциалом имплантации и может указывать на снижение метаболического топлива во время созревания ооцитов [29]. Однако в дальнейшем эта гипотеза не нашла подтверждения в работе Victor A, 2017 [98]. В любом случае недостатком данного подхода является необходимость отдельной постановки реакции ПЦР для получения искомых данных.

В дальнейшем применение высокопроизводительного секвенирования (NGS) для проведения преимплантационного генетического тестирования сделало возможным одновременное изучение как уровня геномной ДНК, так и митохондриальной ДНК, что значительно упростило проведение подобных исследований [40].

Вместе с тем стоит отметить, что результаты, полученные с помощью ПЦР в реальном времени и с помощью NGS, у разных исследователей не совпадают и являются противоречивыми, и судя по представленным выше данным для решения вопроса о возможности использования в качестве маркера качества эмбрионов уровня митохондриальной ДНК необходимо решить ряд методических проблем [102].

## 1.6 Хромосомный мозаицизм

Внедрение метода FISH для проведения ПГТ, как уже ранее отмечалось, не произвело ожидаемого увеличения эффективности соответствующих программ ВРТ. Исследователи связывали это с двумя причинами. Первая причина — это недостаточная информативность метода, который изначально был не в состоянии дать исчерпывающую информацию обо всех хромосомах генома человека. Второй возможной причиной являлся хромосомный мозаицизм в бластомерах.

Хромосомный мозаицизм заключается в том, что клетки одного организма (в частности бластомеры или клетки трофэктодермы эмбриона) могут содержать разный хромосомный набор. Исследования преимплантационных эмбрионов с помощью различных молекулярно-генетических методов, в том числе и полнохромосомных, показали, что уровень мозаицизма таких эмбрионов значителен (ссылка). Выявление анеуплоидии в единичном бластомере приводило к заключению, что такой эмбрион не пригоден для переноса, хотя все остальные клетки эмбриона при этом могли быть нормальными.

В дальнейшем было показано, что исследование трофэктодермы вместо бластомеров является более предпочтительным, так как в ходе исследования происходит анализ сразу нескольких клеток (от 3 до 10), что дает более полную картину возможных хромосомных нарушений в данном эмбрионе [75]. Кроме того было показано, что само по себе явление хромосомного мозаицизма менее выражено на стадии бластоцисты по сравнению с эмбрионом 3-х суток развития [36–38].

Хромосомный мозаицизм может являться важным фактором, влияющим на точность выдаваемых результатов и на верность интерпретации получаемых лабораторных данных. [37, 82] Изучение феномена хромосомного

мозаицизма, частоты его распространенности в различных клетках эмбрионов, является важной задачей преимплантационного генетического тестирования.

Выбор исследуемого материала и применяемого метода проведения ПГТ зависит от множества факторов. Все описанные технологии обладают своими достоинствами и недостатками. В настоящее время возможности aCGH и NGS (скрининг анеуплоидий, диагностика, связанная с митохондриальными заболеваниями и/или моногенными заболеваниями) и исследуемый биологический материал (полярные тельца, бластоциста или стадия деления эмбриона) определены не в полном объеме. Решение этих вопросов требует проведения дальнейших исследований.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего в рамках данной работы с помощью молекулярно-генетических методов был обследован 3691 эмбрион (Таблица 1).

Таблица 1 Материал и методы исследования.

N	Задача	Материалы	Методы
1	Определение оптимального материала для преимплантационного тестирования.	264 бластомера и 1630 образцов трофэктодермы.	aCGH NGS
2	Сравнение результатов ПГТ-А, полученных с помощью aCGH и NGS	38 образцов трофэктодермы эмбрионов.	aCGH NGS
3	Разработка метода генотипирования эмбрионов с помощью STR-анализа.	167 образцов трофэктодермы эмбрионов, полученных от 58 пар пациентов (116 человек).	aCGH, NGS, фрагментный анализ
4	Разработка и применение метода SNP-гаплотипирования.	93 эмбриона из 23 семей с моногенной патологией.	aCGH, NGS, фрагментный анализ, ХМА

N	Задача	Материалы	Методы
5	Изучение особенностей мозаицизма эмбрионов.	68 образцов трофэктодермы и внутренней клеточной массы 17 эмбрионов.	aCGH, NGS
6	Определение копийности митохондриальной ДНК в кумулюсных клетках.	454 ооцит-кумулюсных комплекса 67 пациенток. Для aCGH использовали материал биопсии трофэктодермы 130 эмбрионов.	aCGH, NGS, ПЦР-РВ
7	Определение копийности митохондриальной ДНК в трофэктодерме эмбрионов.	106 образцов трофэктодермы эмбрионов, полученных от 50 пар.	aCGH, NGS, ПЦР-РВ
8	Сравнение уровня анеуплоидий эмбрионов у мужчин с различной долей морфологически нормальных сперматозоидов.	367 образцов трофэктодермы от 147 пар.	aCGH, NGS, ПЦР-РВ
9	Сравнение уровня анеуплоидий эмбрионов у супружеских пар с фрагментацией ДНК сперматозоидов.	425 образцов трофэктодермы от 170 пар.	aCGH, NGS, ПЦР-РВ
10	Всего было обследовано:	3691 эмбрион.	

Из них для определения оптимального материала для преимплантационного тестирования был использован материал биопсии 264 бластомеров и 1630 образцов трофэктодермы.

Для сравнения результатов ПГС, проведенных с помощью aCGH и NGS использовали материал биопсии 38 образцов трофэктодермы эмбрионов.

Для изучения особенностей мозаицизма эмбрионов использовали материал биопсии 68 образцов трофэктодермы и внутренней клеточной массы 17 эмбрионов.

Для разработки метода генотипирования эмбрионов с помощью STR-анализа использовали материал биопсии 167 образцов трофэктодермы эмбрионов, полученных от 58 пар пациентов (116 человек).

В рамках работы по SNP-гаплотипированию было обследовано 93 эмбриона из 23 семей с моногенной патологией.

Определение копийности митохондриальной ДНК в кумулюсе проводили с использованием материала 454 ооцит-кумулюсных комплексов 67 пациенток. Для aCGH использовали материал биопсии трофэктодермы 130 эмбрионов.

Определение копийности митохондриальной ДНК в трофэктодерме эмбрионов осуществляли с использованием материал биопсии 106 образцов трофэктодермы эмбрионов, полученных от 50 пар.

Сравнение уровня анеуплоидий эмбрионов у мужчин с различной долей морфологически нормальных сперматозоидов проводил на материале биопсии 367 образцов трофэктодермы от 147 пар.

Для сравнения уровня анеуплоидий эмбрионов у супружеских пар с фрагментацией ДНК сперматозоидов использовали материал биопсии 425 образцов трофэктодермы от 170 пар.

## **2.1 Сравнение результатов, проведенных с помощью aCGH и NGS**

Использовали материал биопсии 38 образцов трофэктодермы эмбрионов.

aCGH проводили на оборудовании фирмы Agilent, США. Полногеномную амплификацию проводили с помощью PicoPLEX (Rubicon, США) и MDA (Quiagen, США).

Сравнительная геномная гибридизация на биологических чипах включала в себя следующие стадии: полногеномная амплификация (с помощью MDA или PicoPLEX), мечение образцов, очистка меченых образцов, подготовка к гибридизации, гибридизация, отмывка, сканирование.

### **2.1.1 Полногеномная амплификация (MDA)**

1. Приготавливали буфер DLB.
  - a. В предоставленную пробирку буфера DLB добавляли 500 мкл дистиллированной воды, не содержащей нуклеаз, для ресуспендирования лиофилизированного осадка. Тщательно перемешивали и сбрасывали капли.
  - b. Аликвотировали восстановленный буфер DLB. Хранили аликвоты при  $-20^{\circ}\text{C}$  до 6 месяцев.
2. Приготавливали буфер D2 (буфер денатурации). Для этого на 1 реакцию смешивали 0,25 мкл DTT, 1M и 2,75 мкл восстановленного буфера DLB.

3. Добавляли 3 мкл буфера D2 в каждую пробирку с 3 мкл образцов (исследуемые образцы, образцы с мужским и женским референсами и отрицательный контроль). Аккуратно перемешивали встряхиванием. Сбрасывали капли.
4. Помещали пробирки в термостат с температурой крышки 70 ° С. Инкубировали образцы 10 мин при 65 °С, затем охлаждали до 4 °С.
5. К каждому образцу добавляли 3 мкл раствора Stop Solution до общего объема 9 мкл. Аккуратно перемешивали встряхиванием. Сбрасывали капли.
6. Приготавливали Amplification Master Mix (реакционная смесь для амплификации). Для этого на 1 реакцию смешивали 4,5 мкл воды, 14,5 мкл Amplification Reaction Buffer и 1 мкл Amplification DNA Polymerase.
7. Добавляли 20 мкл полученной смеси к 9 мкл образца. Аккуратно перемешивали встряхиванием. Сбрасывали капли.
8. Помещали пробирки в термостат с температурой крышки 70 ° С. Инкубировали образцы 85 мин при 31 °С, затем 10 мин при 65 °С, затем охлаждали до 4 °С.

### **2.1.2 Мечение образцов**

1. Откручивали амплифицированные образцы ДНК в центрифуге в течение 1 минуты при 5 000 × g для удаления содержимого со стенок и крышки.
2. Переносили 13 мкл каждого образца в новую 200 мкл пробирку для ПЦР.

3. Добавляли 2,5 мкл случайных праймеров в каждую реакцию пробирку, чтобы получить общий объем 15,5 мкл. Хорошо перемешивали пипетированием.
4. Переносили пробирки в термоциклер с подогреваемой крышкой. Проводили инкубацию по следующей программе: 98 С 3 мин, 4 С не менее 3х минут, затем хранение.
5. Откручивали пробирки в центрифуге в течение 1 минуты при 5 000 × g для удаления содержимого со стенок и крышки.
6. Смешивали компоненты, приведенные в таблице 2, на льду в порядке, указанном для получения мастер-смеси цианин-3 (Cy3) и мастер-смеси цианин-5 (Cy5).

Таблица 2. Состав реакционной смеси для мечения.

<b>Реагент</b>	<b>мкл на реакцию</b>
5x реакционный буфер	5
10xdNTP микс	2,5
Cy3-dUTP или Cy5-dUTP	1,5
Фрагмент Кленова	0,5
Финальный объем	9,5

7. В каждую реакцию пробирку, содержащую амплифицированную ДНК, добавляли 9,5 мкл мастер-смеси для мечения с получением общего объема 25 мкл. Аккуратно перемешивали.
8. Переносили пробирки в термоциклер с подогреваемой крышкой. Проводили инкубацию по следующей программе: 37 С 45 мин, 65 С 10 мин, хранение при 4 С.

9. Откручивали пробирки в центрифуге в течение 1 минуты при  $5\ 000 \times g$  для удаления содержимого со стенок и крышки.
10. Смешивали образцы, меченые разными красителями, попарно до достижения объема 50 мкл.

### 2.1.3 Очистка меченых образцов

1. Меченую ДНК очищали, используя колонки для очистки после мечения и пробирки, поставляемые с набором для предварительной амплификации и мечения GenetiSure.
2. Откручивали меченые образцы ДНК в центрифуге в течение 1 минуты при  $5\ 000 \times g$ , затем переносили каждый образец по 50 мкл в новую 1,5-мл пробирку.
3. К каждой пробирке добавляли 430 мкл  $1 \times TE$  (pH 8,0).
4. Для каждого парного образца Су3-Су5, подлежащего очистке, маркировали колонку для очистки и помещали ее в 1,5-мл пробирку.
5. Наносили каждый помеченный образец в соответствующую колонку.
6. Закрывали колонки и центрифугировали в течение 15 минут при  $9\ 000 \times g$  в микроцентрифуге при комнатной температуре.
7. Переворачивали и помещали колонки в новые пробирки 1,5-мл, которые были соответствующим образом помечены.
8. Центрифугировали в течение 2 минут при  $2\ 500 \times g$  в микроцентрифуге при комнатной температуре для сбора очищенных образцов.
9. Измеряли объем каждого парного очищенного образца с помощью

пипетки. При необходимости доводили объем образцов до 15 мкл с помощью 1 × TE (pH 8,0).

10. Затем переносили по 15 мкл образца в новые 200 мкл пробирки.

### 2.1.4 Подготовка к гибридизации

1. Смешивали компоненты, указанные в таблице 3 для получения мастер-микса для гибридизации.

Таблица 3. Состав мастер-микса для гибридизации.

<b>Компонент</b>	<b>Объем (μL) на × 8 реакций (μL) (включая гибридизацию избыток)</b>	
<b>Human Cot-1 DNA (1.0 mg/mL)</b>	5	42.5
<b>10× aCGH Blocking Agent*</b>	5	42.5
<b>2× Hi-RPM Hybridization Buffer</b>	25	212.5
<b>Конечный объем</b>	35	297.5

2. Добавляли по 35 мкл мастер-микса в пробирки, содержащие 15 мкл меченой ДНК. Получали 50 мкл смеси для гибридизации. Перемешивали смесь пипетированием и сбрасывали капли на микроцентрифуге.
3. Помещали пробирки в термоциклер с нагревающейся крышкой и инкубировали по программе, указанной в таблице 4.

4. После инкубации центрифугировали образцы 1 мин при  $5,000 \times g$ .
5. Сразу после этого наносили на биочип.

Таблица 4. Программа гибридизации.

Этап	Температура	Время
Этап 1	98°C	2 минуты
Этап 2	37°C	18 минут

### 2.1.5 Гибридизация, отмывка и сканирование.

1. Для гибридизации использовали специальную камеру с резиновыми прокладками на 8 чипов.
2. Аккуратно наносили 47 мкл смеси в центр каждого «окошка» избегая попадания пузырей.
3. Сверху накрывали чипом Agilent GenetiSure 8x60 и туго затягивали крепежные болты камеры.
4. Помещали камеру с чипом вертикально в гибридизационную печь с ротором.
5. Инкубировали в течение 16 – 18 часов при температуре 67°C.
6. Далее проводили отмывку чипа последовательно в трех емкостях по алгоритму, представленному в таблице 5.

Таблица 5 Условия отмывки чипов.

	Емкость	Буфер	Температура	Время
<b>Разборка камеры чипом</b>	#1 с	Agilent aCGH/ChIP-on- Chip Wash Buffer 1	Oligo комнатная	
<b>Первая отмывка</b>	#2	Agilent aCGH/ChIP-on- Chip Wash Buffer 1	Oligo комнатная	5 мин
<b>Вторая отмывка</b>	#3	Agilent aCGH/ChIP-on- Chip Wash Buffer 2	Oligo 37°C	1 мин

7. Помещали отмывтый чип в пластиковый держатель и накрывали озоновым барьером. Полученную конструкцию помещали в сканер (рисунок 1) и производили сканирование с системными настройками «Protocol AgilentG3\_CGH».



Рисунок 1. Прибор для проведения aCGH Agilent SureScan  
Microarray Scanner.

### **2.1.6 Проведение NGS**

Высокопроизводительное секвенирование состояло из следующих этапов: амплификация ДНК биоптатов эмбрионов, пулирование, очистка и приготовление библиотек, проведение секвенирования и анализ результатов.

NGS проводили на наборах ReproSeq (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Библиотеки ДНК получали с помощью Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific, США), Секвенирование осуществлялось на платформе Ion Proton Torrent с наборами Ion PI Sequencing 200 Kit v3 и чипами Ion PI Chip v2 согласно инструкции производителя.

### 2.1.6.1 Амплификация ДНК биоптатов эмбрионов

1. Добавляли 2,5 мкл Cell Extraction Buffer к 2,5 мкл каждого образца, чтобы конечный объем реакционной смеси стал 5 мкл.
2. Приготавливали Extraction Enzyme master mix на холоде в 1,5 мл пробирке исходя из расчета 4,8 мкл Extraction Enzyme Dilution Buffer и 0,2 мкл Cell Extraction Enzyme на 1 реакцию.
3. Добавляли 5 мкл полученной смеси в каждую пробирку с образцом (финальный объем 10 мкл).
4. Аккуратно перемешивали встряхиванием, сбрасывали капли на микроцентрифуге.
5. Проводили инкубирование в программируемом термостате по программе, указанной в таблице 6.

Таблица 6. Программа инкубации для лизирования биоптатов

<b>Температура</b>	<b>Время</b>
<b>75 градусов</b>	10 минут
<b>95 градусов</b>	4 минуты
<b>22 градуса</b>	пауза

6. Вынимали пробирки из программируемого термостата и помещали на холод.

7. Готовили Pre-amplification master mix на холоде в 1,5 мл пробирке исходя из расчета 4,8 мкл Pre-Amplification Buffer и 0,2 мкл Pre-Amplification Enzyme на 1 реакцию.
8. Добавляли 5 мкл полученной смеси в каждую пробирку с образцом (финальный объем 15 мкл).
9. Аккуратно перемешивали встряхиванием, сбрасывали капли на микроцентрифуге.
10. Проводили инкубирование в программируемом термостате по программе, представленной в таблице 7.

Таблица 7. Программа инкубации преамплификации ДНК.

Этап	Температура	Время	Число циклов
<b>1</b>	95 градусов	2 минуты	1
	95 градусов	15 секунд	
	15 градусов	50 секунд	
<b>2</b>	25 градусов	40 секунд	12
	35 градусов	30 секунд	
	65 градусов	40 секунд	
	75 градусов	40 секунд	
<b>3</b>	4 градуса	пауза	

11. Вынимали пробирки из программируемого термостата и помещали на холод.
12. Подготавливали SingleSeq Barcodes: проводили размораживание плашки с баркодами при комнатной температуре в течение 10 минут.
13. Центрифугировали плашку для сброса капель

14. Готовили Amplification master mix на холоде в 1,5 мл пробирке исходя из расчета Amplification Buffer 27 мкл, Amplification Enzyme 0,5 мкл, Nuclease-free water 2,5 мкл на одну реакцию.
15. Аккуратно перемешивали встряхиванием и сбрасывали капли на микроцентрифуге.
16. Добавляли по 30 мкл полученной смеси в каждую пробирку (финальный объем 45 мкл).
17. Прокалывали фольгу в каждой лунке баркода и добавляли по 5 мкл в соответствующие пробирки (финальный объем 50 мкл).
18. Перемешивали пипетированием и сбрасывали капли на микроцентрифуге.
19. Проводили инкубирование в программируемом термостате по программе, представленной в таблице 8.
20. Вынимали пробирки из программируемого термостата и передавали полученные продукты амплификации для пулирования, очистки и приготовления библиотек.

Таблица 8. Программа амплификации ДНК.

<b>Этап</b>	<b>Температура</b>	<b>Время</b>	<b>Число циклов</b>
<b>1</b>	95 градусов	3 минуты	1
	95 градусов	20 секунд	
<b>2</b>	50 градусов	25 секунд	4
	72 градуса	40 секунд	
<b>3</b>	95 градусов	20 секунд	12
	72 градуса	55 секунд	
<b>4</b>	4 градуса	пауза	1

### 2.1.6.2 Пулирование, очистка и приготовление библиотек.

1. Добавляли по 5 мкл из каждой реакционной пробирки в новую пробирку на 1,5 мл. Перемешивали вортексированием и сбрасывали капли.
2. Переносили 40 мкл полученной смеси в пробирку на 0,2 мл.
3. Помещали пробирку в программируемый термоциклер и инкубировали по программе, представленной в таблице 9.

Таблица 9. Программа прогрева пулированной библиотеки перед очисткой.

Этап	Температура	Время	Число циклов
1	70 градусов	2 минуты	1
2	22 градуса	пауза	1

4. Сбрасывали капли и переносили 40 мкл прогретой смеси в пробирку Eppendorf DNA LoBind на 1,5 мл.
5. К содержимому добавляли 40 мкл магнитных частиц AMPure XP beads.
6. Встряхивали вортексированием, сбрасывали капли на микроцентрифуге, инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре.
7. Помещали пробирку на магнитный штатив DynaMag-2 на 5 минут вплоть до полной агрегации магнитных частиц на стенке пробирки.
8. Супернатант полностью убирали из пробирки с помощью пипетки.
9. Промывали магнитные частицы свежеприготовленным 70% этанолом объемом 250 мкл не убирая пробирку с магнитного штатива.
10. Инкубировали 30 секунд.

11. Супернатант полностью убирали из пробирки с помощью пипетки.
12. Повторяли шаги 2.9 – 2.11. Тщательно убирали остатки этанола после второй промывки.
13. Инкубировали магнитные частицы в течение 3-4 минут до полного высыхания, не убирая пробирку с магнитного штатива.
14. После высыхания снимали пробирку с магнитного штатива, добавляли 40 мкл TE буфера и перемешивали пипетированием.
15. Инкубировали 1 минуту при комнатной температуре.
16. Помещали пробирку на магнитный штатив и ожидали 2-3 минуты вплоть до полной агрегации магнитных частиц на стенке пробирки.
17. Аккуратно, не допуская попадания магнитных частиц, переносили 35 мкл очищенной библиотеки в новую пробирку на 1,5 мл и помещали на холод.
18. Проводили измерение полученной библиотеки с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit согласно инструкции производителя.
19. Используя результаты измерений разводили библиотеку до конечной концентрации 1nM.

### **2.1.6.3 Высокопроизводительное секвенирование.**

1. С полученной библиотекой работали с помощью прибора Ion Chef System (рисунок 2).
2. Секвенирование подготовленных библиотек проводили с помощью прибора Ion S5 XL Sequencer (рисунок 3) согласно инструкции производителя.



Рисунок 2. Прибор Ion Chef System.



Рисунок 3. Прибор Ion S5 XL.

## **2.2 Изучение особенностей мозаицизма эмбрионов**

Использовали материал биопсии 68 образцов трофэктодермы и внутренней клеточной массы, полученные от 17 эмбрионов.

aCGH проводили на оборудовании фирмы Agilent, США. Полногеномную амплификацию проводили с помощью PicoPLEX (Rubicon, США) согласно инструкции производителя, как описано выше.

NGS проводили на наборах ReproSeq (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя как описано выше.

## **2.3 Генотипирование эмбрионов с помощью STR-анализа**

Для разработки данного метода использовали материал биопсии 167 образцов трофэктодермы эмбрионов, полученных от 58 пар пациентов (116 человек).

Полногеномную амплификацию проводили с помощью PicoPLEX (Rubicon, США) и MDA (Quiagen, США). ПГТ-А выполняли на наборах ReproSeq (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Меченые флуорофором праймеры для проведения фрагментного анализа были разработаны в рамках данного исследования.

### 2.3.1 Полногеномная амплификация (PicoPLEX)

1. Приготавливали смесь для экстракции ДНК из единичных клеток. Для этого на одну реакцию смешивали 4,8 мкл Extraction Enzyme Dilution Buffer, 0,2 мкл Cell Extraction Enzyme и 2,5 мкл Cell Extraction Buffer
2. Добавляли 7,5 мкл этого микса к 2,5 мкл среды для промывки ооцитов (флашинг) с содержащимися в ней клетками трофэктодермы или бластомерами.
3. Сбрасывали капли на микроцентрифуге.
4. Пробирки с 10 мкл получившейся смеси помещали в амплификатор и инкубировали при температуре 75° С 10 мин, затем при 95° С 4 мин.
5. Приготавливали смесь для преамплификации. Для этого на одну реакцию смешивали 4,8 мкл Pre-Amp Buffer и 0,2 мкл Pre-Amp Enzyme.
6. Добавляли в реакционные пробирки по 5 мкл этой смеси, помещали в амплификатор и инкубировали по следующей программе, представленной в таблице 10.

Таблица 10. Программа преамплификации.

Количество циклов	Температура, градусов	
	С.	Время
1	95	2 мин
12	95	15 сек
	15	50 сек
	25	40 сек
	35	30 сек
	65	40 сек
	75	40 сек
1	4	пауза

7. Приготавливали смесь для амплификации. Для этого на одну реакцию

смешивали 25 мкл Amplification Buffer, 0,8 мкл Amplification Enzyme и 34,2 мкл MQ-воды.

8. Добавляли в реакционные пробирки по 60 мкл этой смеси, помещали в амплификатор и инкубировали по следующей программе (таблица 11).
9. Продукты амплификации хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  вплоть до дальнейшего использования.

Таблица 11. Программа амплификации.

Количество циклов	Температура, градусов С.	Время
1	95	2 мин
14	95	15 сек
	65	1 мин
	75	1 мин
1	4	пауза

### 2.3.2 Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ПЦР проводили с помощью Универсального набора реагентов для проведения ПЦР (ДНК-Технология, Россия)

1. Маркировали необходимое количество пробирок для амплификации для исследуемых образцов, включая положительные и отрицательные контрольные образцы.
2. Размораживали при комнатной температуре и встряхивали пробирки с 5х смесью ПЦР-буфера +  $\text{MgCl}_2$  + dNTPs, деионизованной водой на вортексе в течение 3-5 с.
3. Доставали из морозильной камеры пробирку с Полимеразой ТехноТақ МАХ непосредственно перед приготовлением реакционной смеси, встряхивали на вортексе в течение 3-5 с.
4. Центрифугировали пробирки со всеми компонентами набора при

1 000 об/мин в течение 1-3 с.

5. В отдельной пробирке готовили реакцию смесь исходя из количества исследуемых и контрольных образцов:
  - a. 5x смесь ПЦР-буфера+ MgCl<sub>2</sub> + dNTPs – 7,0 мкл,
  - b. Полимераза ТехноТaq МАХ - 0,5 мкл,
  - c. Олигонуклеотиды – суммарно не более 22,5 мкл,
  - d. Образец ДНК -1-5 мкл.
  - e. Вода деионизованная - до 35 мкл.
6. Закрывали крышку пробирки с реакционной смесью, встряхивали пробирку в течение 3–5 сек и центрифугировали в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
7. Вносили в каждую пробирку для амплификации расчетный объём реакционной смеси.
8. Вносили необходимый объём образцов ДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов.
9. Закрывали крышки.
10. Центрифугировали пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 1–3 сек.
11. Устанавливали все пробирки в блок амплификатора и проводили ПЦР.

Амплификацию проводили с помощью амплификаторов ДТ-96 (ДНК-Технология, Россия).

Программа амплификации выбиралась с учетом температуры отжига праймеров и используемого фермента (с горячим стартом или без). При использовании горячего старта проводилась предварительная инкубация

смеси при 95 °С в течение 15 минут перед проведением основной программы ПЦР.

### 2.3.3 Выделение ДНК из крови

Выделение ДНК из образцов крови проводили с помощью набора PureLink® Genomic DNA Kit (Invitrogene, США).

1. Устанавливали термостат на температуру 55 °С.
2. В стерильную микроцентрифужную пробирку добавляли 200 мкл свежего или замороженного образца крови.
3. Добавляли 20 мкл протеиназы К (поставляемой вместе с набором) к образцу.
4. Добавляли 20 мкл RNase А (поставляемой вместе с набором) к образцу, тщательно перемешивали, встряхивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 минут.
5. Добавляли 200 мкл буфера для геномного лизиса/связывания PureLink ® и хорошо перемешивали для получения гомогенного раствора.
6. Инкубировали при 55 °С в течение 10 минут.
7. К лизату добавляли 200 мкл 96-100% этанола. Хорошо перемешивали с помощью вортексирования в течение 5 секунд для получения гомогенного раствора.
8. Наносили лизат (~ 640 мкл) в колонку Spin Column PureLink ®.
9. Центрифугировали колонку при 10 000 × g в течение 1 мин при комнатной температуре.
10. Переносили колонку в чистую пробирку PureLink ®, поставляемую вместе с комплектом.
11. В колонку добавляли 500 мкл промывочного буфера 1,

приготовленного с этанолом.

12. Центрифугировали колонку при комнатной температуре  $10\ 000 \times g$  в течение 1 мин.
13. Переносили колонку в чистую пробирку PureLink ®, поставляемую вместе с комплектом.
14. В колонку добавляли 500 мкл промывочного буфера 2, приготовленного с этанолом.
15. Центрифугировали колонку с максимальной скоростью в течение 3 минут при комнатной температуре.
16. Переносили колонку в стерильную 1.5-mL пробирку.
17. В колонку добавляли 50 мкл буфера для геномного элюирования PureLink ®.
18. Инкубировали при комнатной температуре в течение 1 мин.
19. Центрифугировали колонку на максимальной скорости в течение 1 минуты при комнатной температуре.
20. Полученные образцы хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.3.4 Фрагментный анализ**

Фрагментный анализ проводили на приборе Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя. Анализ и сравнение полученных профилей проводили с помощью программы GeneMapper ID v3.2.1.

## 2.4 SNP-гаплотипирование

В рамках данной работы было обследовано 23 семьи с моногенной патологией

Полногеномную амплификацию проводили с помощью PicoPLEX (Rubicon, США) и MDA (Quiagen, США) как описано выше.

Для анализа наиболее частых мутаций (например, F508del при муковисцидозе, GJB2: 35delG при врожденной нейросенсорной тугоухости) применяли ПЦР-РВ с применением оригинальных праймеров и зондов. Методика проведения ПЦР описана выше.

Секвенирование по Сэнгеру проводили на приборе Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя. Выравнивание полученных хроматограмм проводили при помощи программного обеспечения Sequencing Analysis 5.3.1 (Applied Biosystems).

ПГТ-А осуществляли с помощью NGS (ReproSeq™ PGS Kit Thermo Fisher Scientific, USA) и aCGH (GenetiSure Agilent, USA) согласно инструкции производителя, как описано выше.

SNP-гаплотипирование осуществляли путем проведения гибридизации продуктов амплификации на чипах CytoScan 750K (Affymetrix Inc., США) согласно инструкции производителя, с последующим анализом с помощью разработанного в рамках данного исследования алгоритма.

## **2.5 Определение копийности митохондриальной ДНК в кумулюсе и трофэктодерме эмбрионов**

Использовали материал 454 ооцит-кумулюсных комплексов 67 пациенток. Для aCGH использовали материал биопсии трофэктодермы 130 эмбрионов.

aCGH проводили на оборудовании фирмы Agilent, США. Полногеномную амплификацию проводили с помощью PicoPLEX (Rubicon, США) согласно инструкции производителя.

Копийность мтДНК определяли с помощью ПЦР-РВ. TaqMan-пробы и праймеры для определения специфических фрагментов мтДНК (гены MT-ND2 и MT-ND4) были специально разработаны в рамках данного исследования. Нормировку полученных результатов проводили на геномную ДНК (ген LTC4S).

### **2.5.1 Определение копийности митохондриальной ДНК с помощью проведения ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени**

Относительную количественную оценку копийности митохондриальной ДНК проводили с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

В реакции использовали специально разработанные олигонуклеотиды и TaqMan-пробы для амплификации и количественного определения специфического фрагмента мтДНК (ген MT-ND2 *mitochondrially encoded*

## NADH dehydrogenase

Нормировку осуществляли на геномную ДНК (ген LTC4S - leukotriene C4 synthase).

TaqMan-пробы для фрагментов митохондриальной и геномной ДНК метили разными флуорофорами (FAM и HEX), что позволило проводить реакцию в одной пробирке (мультиплексная ПЦР), реакцию проводили в двух повторях для каждого образца.

Для обеспечения «горячего старта» использовали парафин.

В работе использовали реактивы и детектирующие амплификаторы «ДТпрайм» (ООО «ДНК-Технология», Россия) в соответствии с инструкциями и рекомендациями производителя. Режим амплификации: 80 °С в течение 1 мин, при 95 °С в течение 1 мин, а затем 50 циклов: 94 °С в течение 15с и 64°С в течение 20с с измерением уровня флуоресценции на каждом цикле.

### **2.5.2 Определение копийности митохондриальной ДНК в трофэктодерме эмбрионов**

Использовали материал биопсии 106 образцов трофэктодермы эмбрионов, полученных от 50 пар.

aCGH проводили на оборудовании фирмы Agilent, США. Полногеномную амплификацию проводили с помощью PicoPLEX (Rubicon, США) и MDA (Quiagen, США). NGS проводили на наборах ReproSeq (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя.

Копийность мтДНК определяли с помощью ПЦР-РВ. TaqMan-пробы и

праймеры для определения специфического фрагмента мтДНК (ген МТ-ND2) были специально разработаны в рамках данного исследования. Нормировку полученных результатов проводили на геномную ДНК (ген LTC4S).

## **2.6 Сравнение уровня анеуплоидий эмбрионов у мужчин с различной долей морфологически нормальных сперматозоидов**

В исследование были включены 147 пар.

аCGH проводили на оборудовании фирмы Agilent, США. Полногеномную амплификацию проводили с помощью PicoPLEX (Rubicon, США) согласно инструкции производителя как описано выше.

## **2.7 Сравнение уровня анеуплоидий эмбрионов у супружеских пар с фрагментацией ДНК сперматозоидов**

В исследование были включены 170 пар.

аCGH проводили на оборудовании фирмы Agilent, США. Полногеномную амплификацию проводили с помощью PicoPLEX (Rubicon, США) согласно инструкции производителя как описано выше.

## 2.8 Статистическая обработка данных

При нормальном виде распределения данных применяли методы параметрической статистики (t-тест для сравнения данных в 2-х группах). При ненормальном распределении данных для оценки различий в группах применяли методы непараметрической статистики (точный критерий Фишера). Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$  (95% уровень значимости), при  $p < 0,01$  (99% уровень значимости). Статистическая обработка данных выполнена на индивидуальном компьютере с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и пакета прикладных программ «SPSS Statistics 17.0».

Количественные данные после определения вида распределения (нормальное или ненормальное) были представлены в виде средних значений со стандартным отклонением (Mean $\pm$ SD) с применением параметрической статистики (t-тест), или медиан с интерквартильным размахом (Me(Q1;Q3)) с применением методов непараметрической статистики (тест Манна-Уитни). Корреляционный анализ проводился с использованием непараметрического корреляционного критерия Спирмена.

Для сравнения средних в группах применяли непараметрический критерий Манна-Уитни-Уилкоксона, рассчитанный с помощью программы Statistica 6.0

Для сравнения средних в группах применяли модификацию t-теста Стьюдента для наблюдений с весами, реализованную в пакете R language. В качестве весов использовали число биопсированных эмбрионов. Для подтверждения полученных результатов также применяли непараметрический критерий Манна-Уитни-Уилкоксона, рассчитанный с помощью программы Statistica 6.0

Количество мтДНК относительно геномной определяли методом сравнения пороговых циклов ( $2\Delta C_p$ ) и представляли в относительных единицах (о.е.).

Пороговые значения мтДНК установлены с использованием ROC-анализа при сравнении образцов трофэктодермы имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов, с площадью под ROC-кривой (AUC) > 0,80, что говорит о высокой точности.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1 Трофэктодерма – основной материал для проведения преимплантационного генетического тестирования

С момента внедрения ПГТ-А в практику ФГБУ НЦАГП им.В.И.Кулакова МЗ РФ в 2013 году работа проводилась на единичных бластомерах эмбрионов 3-х суток развития. При работе в свежем цикле исследование выполняли в течении 3-х дней. Таким образом на 5-е сутки развития можно было уже иметь информацию о хромосомном статусе эмбрионов и решать вопрос об их перспективности непосредственно в день переноса. Однако у данного подхода, кроме ряда организационных затруднений, существует и главный недостаток – отсутствие продуктов реакции амплификации из-за того, что в качестве матрицы используется ДНК из единичной клетки. При использовании подобного подхода на первом этапе исследования в 2013 году было проанализировано 264 бластомера, и в 24 случаях (9,1%) получить результаты не удалось в связи с отсутствием продуктов амплификации.

Параллельно работе с бластомерами в Центре с апреля 2014 года в практику внедряли в качестве материала для исследования трофэктодерму эмбрионов 5-х суток развития, полученную перед их криоконсервированием. Трофэктодерма содержит от трех до десяти клеток (в среднем пять клеток) и, таким образом, количество исходной ДНК значительно превышает таковое при использовании биопсии бластомеров. Увеличение количества клеток способствовало уменьшению отрицательных результатов полногеномной

амплификации. В 2020 году обследовано 1630 образцов трофэктодермы, из которых в 27 случаях (1,7%) полногеномная амплификация не удалась.

Заслуживает внимания тот факт, что из 264 проанализированных за 2013 год бластомеров лишь у 65 (24,6%) не выявлены анеуплоидии, а оставшиеся 199 эмбрионов (75,4%) не были рекомендованы к переносу. При использовании в качестве материала для ПГТ-А трофэктодермы в 2020 году из 1630 обследованных эмбрионов для переноса было рекомендовано 884 эмбриона, что составляет 54,2%. Кроме того, среди всех обследованных в 2020 году эмбрионов были обнаружены 107 эмбрионов с мозаичным генотипом, что составляет 6,6% от их общего числа.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что использование в качестве исходного материала для проведения ПГТ нескольких клеток предпочтительнее, чем одной. Это связано как с уменьшением доли случаев не прохождения полногеномной амплификации, так и с возможностью анализа хромосомного мозаицизма в исследуемых эмбрионах.

Таким образом было показано, что для проведения ПГТ-А материал биопсии трофэктодермы эмбрионов 5-х суток развития предпочтительнее материала биопсии единичных бластомеров эмбрионов 3-х суток развития.

### **3.2 Первый российский опыт применения преимплантационных генетических технологий с помощью методов aCGH и NGS**

В проведенной работе мы оценили возможности проведения ПГТ с использованием полупроводникового NGS, а также сравнили результаты,

получаемые с помощью высокопроизводительного секвенирования и методом array-CGH на платформе Agilent. В настоящей работе не применяли FISH – метод из-за ограниченного числа анализируемых хромосом. Для данного исследования в рамках ПГТ проводили полногеномную амплификацию биоптатов трофэктодермы как с помощью PicoPLEX, так и с помощью MDA. Полученные продукты полногеномной амплификации исследовали с помощью array-CGH (Agilent), а также с помощью высокопроизводительного секвенирования (Thermo Fisher Scientific, США). При исследовании методами aCGH и NGS трофэктодермы 38 эмбрионов получены результаты, представленные в таблице 12.

Таблица 12 Результаты ПГТ-А трофэктодермы aCGH и NGS методами

Номер образца	Метод амплификации	Молекулярный кариотип эмбриона	
		aCGH метод	NGS метод
1	PicoPLEX	+10,+12,XY	+10,+12,XY
2	«- »	XX/XY mos	XX/XY mos
3	«- »	N,XY	N,XY
4	«- »	XX,+1+4 mos	XX,+1+4 mos (10-15%)
5	«- »	N, XX	N, XX
6	«- »	N, XX	N, XX
7	«- »	N, XX	N, XX
8	«- »	N, XX	N, XX
9	«- »	N, XX	N, XX
10	«- »	N, XY	N, XY
<b>11</b>	«- »	<b>XXY</b>	<b>N, XY</b>
12	«- »	+4, XY	+4, XY

Номер образца	Метод амплификации	Молекулярный кариотип эмбриона	
13	«- »	N, XY	N, XY
<b>14</b>	«- »	<b>XXY</b>	<b>N, XX</b>
15	«- »	N, XY	N, XY
16	«- »	N, XY	N, XY
17	«- »	+16,XX(q-плечо)	+16,XX(q-плечо)
18	«- »	N, XX	N, XX
19	«- »	N, XX	N, XX
20	«- »	гетероплоидный	гетероплоидный
21	MDA «- »	N, XX	N, XX
22	«- »	N, XY	N, XY
23	«- »	N, XY	N, XY
24	«- »	N, XY	N, XY
25	«- »	-16, XY	-16, XY
26	«- »	N, XY	N, XY
27	«- »	N, XY	N, XY
28	«- »	N, XY	N, XY
29	«- »	N, XY	N, XY
30	«- »	N, XY	N, XY
31	PicoPLEX	N, XX	N, XX
32	«- »	N, XX	N, XX
33	«- »	гетероплоидный	гетероплоидный
34	«- »	гетероплоидный	гетероплоидный

Номер образца	Метод амплификации	Молекулярный кариотип эмбриона	
		гетероплоидный	гетероплоидный
35	«- »	гетероплоидный	гетероплоидный
36	«- »	-13,+14,XY	-13,+14,XY
37	«- »	-19,-22,XY	-19,-22,XY
38	«- »	-15,-22,XY	-15,-22,XY

Из предоставленных данных следует, что при использовании aCGH метода у 23 (60,6%) эмбрионов установлен нормальный кариотип и у 15 (39,4%) эмбрионов –патологический. Из 15 анеуплоидных эмбрионов у 7-ми отмечены числовые нарушения по 1 и 2-м хромосомам, у 2-х – по половым хромосомам, у 4-х (N/N 20,33,34,34) - множественные хромосомные нарушения, у 2-х – мозаицизм. При применении NGS метода анеуплоидии выявлены у 13 (34,3%) эмбрионов: числовые нарушения по половым хромосомам отсутствовали. По данным aCGH метода образцы 11 и 14 имели кариотип 47, XXУ, однако методом NGS у них диагностирован нормальный набор хромосом. Таким образом результаты, полученные методами aCGH и NGS в 36 (94,8%) наблюдениях были сходные и в 2-х (5,2%) имели расхождение.

В настоящем исследовании в качестве метода амплификации нуклеиновых кислот использовали не только PicoPLEX (SurePlex), но и MDA (RepliG). По данным измерения флуоресценции на биочипе были установлены различия в результатах, получаемых этими методами. При применении MDA наблюдали уменьшение соотношения сигнал / шум по сравнению с PicoPLEX (SurePlex)., что наглядно демонстрируют графики, представленные рисунке 4 и рисунке 5.

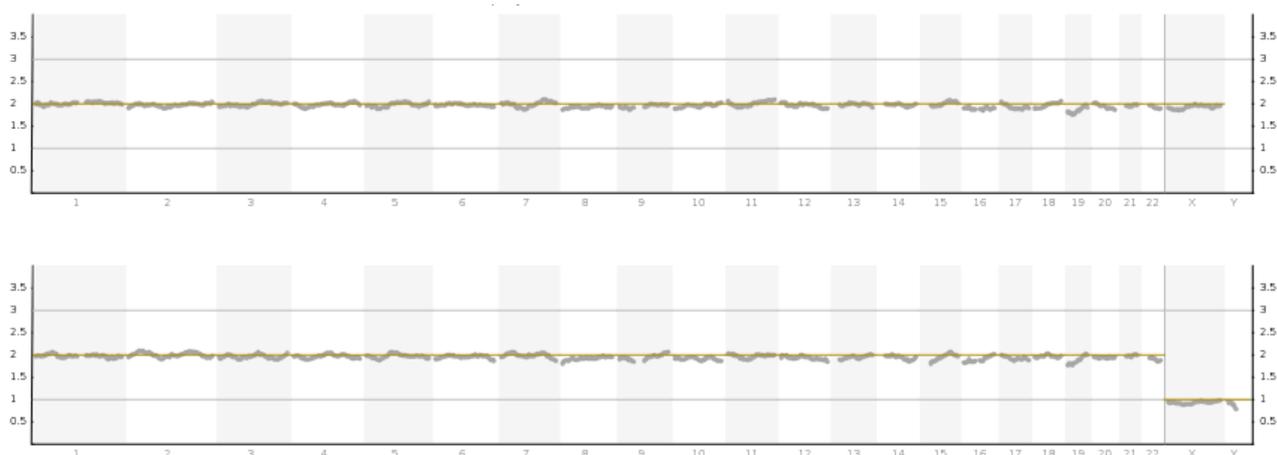


Рисунок 4. График после амплификации трофэктодермы с помощью  
MDA

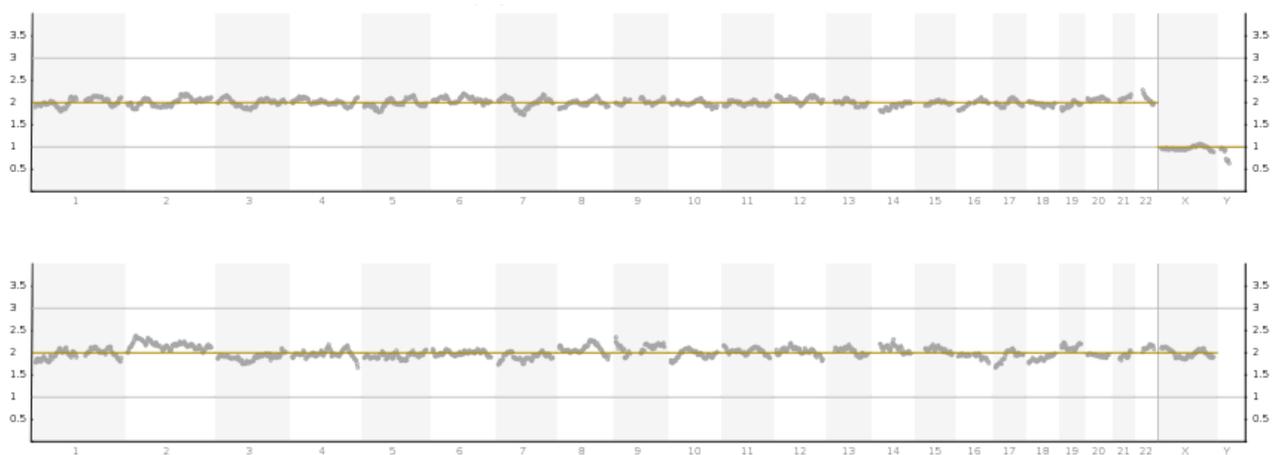


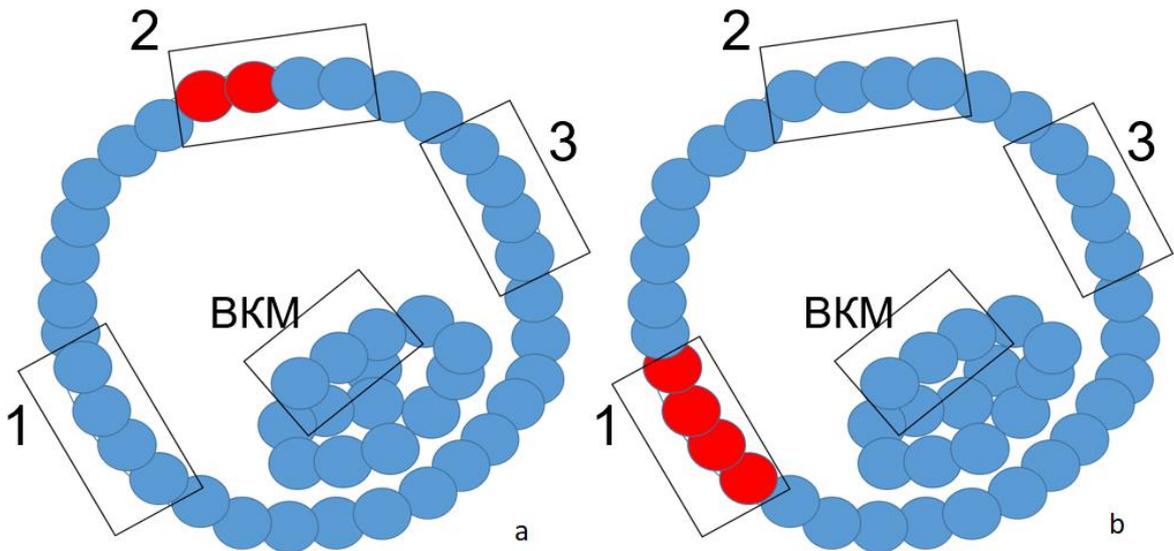
Рисунок 5. График после амплификации трофэктодермы с помощью  
PicoPLEX.

### 3.3 Особенности мозаицизма эмбрионов

С целью изучения особенностей хромосомного мозаицизма был проведен анализ трофэктодермы и внутренней клеточной массы 17 эмбрионов. Они не были рекомендованы к переносу в полость матки из-за наличия хромосомных нарушений в образцах биопсии трофэктодермы, найденных с помощью метода aCGH. В дальнейшем у этих эмбрионов проводили повторную биопсию двух других участков трофэктодермы и внутренней клеточной массы. Исследование этих образцов проводили уже с помощью метода NGS.

Эмбрион признавался мозаичным в двух случаях:

1. Если мозаицизм наблюдался непосредственно в ходе экспериментально полученных данных при исследовании любого из четырех образцов одного эмбриона (рисунок ба).
2. Если хотя бы один результат из четырех (три образца трофэктодермы и один образец внутренней клеточной массы для каждого эмбриона) отличался от остальных (рисунок бб).



1, 2, 3 – образцы биопсии трофэктодермы  
 В.К.М – образцы биопсии внутренней клеточной массы  
 Красный цвет – клетки с анеуплоидиями  
 Голубой цвет – клетки без анеуплоидий (эуплоидные)

Рисунок 6 Выявление мозаицизма в эмбрионах. Пояснение в тексте.

Мозаицизм был выявлен в 10 исследованных эмбрионах из 17, что составило 59%. Однако поскольку исследование проводилось с помощью двух методов, это могло оказать влияние на число наблюдений мозаицизма. Сравнение результатов, полученных из второго, третьего фрагмента трофэктодермы, а также внутренней клеточной массы, проводившихся только при помощи NGS, показало наличие мозаицизма уже в 7 эмбрионах, что составило 41%. Расхождение результатов, полученных с помощью двух разных методов связано, по-видимому, с техническими ограничениями таковых.

Для оценки потенциального клинического значения феномена мозаицизма проводился анализ того, насколько результаты биопсии трофэктодермы совпадали с результатами биопсии внутренней клеточной

массы (пригоден или не пригоден для переноса). Из таблицы 13 следует, что феномен мозаицизма широко распространен в эмбрионах человека, однако вероятность того, что при исследовании образца трофэктодермы будут получены результаты, не совпадающие с результатами анализа внутренней клеточной массы, не превышает 6%.

Таблица 13. Молекулярный кариотип образцов трофэктодермы и внутренней клеточной массы 17 эмбрионов.

Номер эмбриона	Молекулярный кариотип				1*	2**	3***
	Образец трофэктодермы 1	Образец трофэктодермы 2	Образец трофэктодермы 3	Внутренняя клеточная масса			
1	arr(6q24q27)x1, (15)x3	seq(6q24q27)x1, (15)x3	seq(6q24q27)x1, (15)x3	seq(6q24q27)x1, (15)x3	нет	нет	нет
2	<b>arr(22)x1</b>	<b>seq(22)x1</b>	<b>seq(22)x1</b>	<b>seq(10)x2.5, (22)x1</b>	<b>есть</b>	<b>нет</b>	<b>есть</b>
3	arr(21)x3	seq(21)x3	seq(21)x3	seq(21)x3	нет	нет	нет
4	arr(1)x3, (17)x1.5, (19)x1.5	seq(1)x3	seq(1)x3	seq(1)x3	есть	нет	нет
5	arr(21)x1	seq(21)x1	seq(21)x1	seq(21)x1	нет	нет	нет
6	arr(21)x1	seq(22)x2.5	seq(11q24q25)x1.5, (22)x3	seq(22)x3	есть	нет	есть
7	arr(22)x1.5	seq(1-22)x2, (X,Y)x1	seq(1-22)x2, (X,Y)x1	seq(2)x1.6, (6)x2.35, (10)x2.4, (14)x2.4, (20)x1.7	есть	нет	есть
8	arr(12)x1	seq(12p13p11)x1,	seq(12p13p11)x1, (19)x1.6	seq(12p13p11)x1	есть	нет	есть

Номер эмбриона	Молекулярный кариотип				1*	2**	3***
	Образец трофэктодермы 1	Образец трофэктодермы 2	Образец трофэктодермы 3	Внутренняя клеточная масса			
		(12q11q24)x1.6					
9	arr(7)x1, (22)x0.5	seq(7)x1	seq(7)x1	seq(7)x1	есть	нет	нет
10	arr(X)x2, (Y)x1	seq(1-22, X)x2	seq(1-22, X)x2	seq(1-22, X)x2	есть	есть	нет
11	arr(10)x3	seq(1q21q44)x2.45, (7)x2.65, (8)x2.3, (10)x3, (14)x1.7, (16)x1.7, (17)x2.3, (21)x1.6, (X)x1.3, (Y)x0.5	seq(10)x3, (19)x1.65, (X)x1.3	seq(10)x3, (X)x1.4	есть	нет	есть
12	arr(2p25p11)x1, (9)x3, (X)x2, (Y)x1	seq(2p25p11)x1.45, (9)x3, (16)x1.4, (X)x1.25, (Y)x0.7	seq(2)x1.4, (9)x2.5, (16)x1.4, (X)x1.4, (Y)x0.7	seq(2p25p22)x1, (2p22p11)x3, (9)x2.7, (16)x1.4, (X)x1.25, (Y)x0.7	есть	нет	есть
13	arr(4)x1	seq(4)x1	seq(4)x1	seq(4)x1	нет	нет	нет
14	arr(2p25p11)x1	seq(2p25p11)x1	seq(2p25p11)x1	seq(2p25p11)x1	нет	нет	нет
15	arr(14)x1	seq(14)x1	НД	НД	нет	НД	НД

Номер эмбриона	Молекулярный кариотип				1*	2**	3***
	Образец трофэктодермы 1	Образец трофэктодермы 2	Образец трофэктодермы 3	Внутренняя клеточная масса			
16	arr(16q11q24)x3	seq(16q11q24)x3	seq(16q11q24)x3	seq(2q21q37)x1, (9q22q34)x1, (16q11q24)x3	есть	нет	есть
17	arr(1-22)x2, (X,Y)x1	seq(1-22)x2, (X,Y)x1	seq(1-22)x2, (X,Y)x1	seq(1-22)x2, (X,Y)x1	нет	нет	нет

1\* - Мозаицизм

2\*\* - Вероятность ложного заключения

3\*\*\* - Мозаицизм методом NGS

Интерес представляют результаты двух эмбрионов, в которых были обнаружены дополнительные хромосомные нарушения в образце клеток из внутренней клеточной массы и трофэктодермы N12 и N2, представленные на рисунке 7 и рисунке 8.

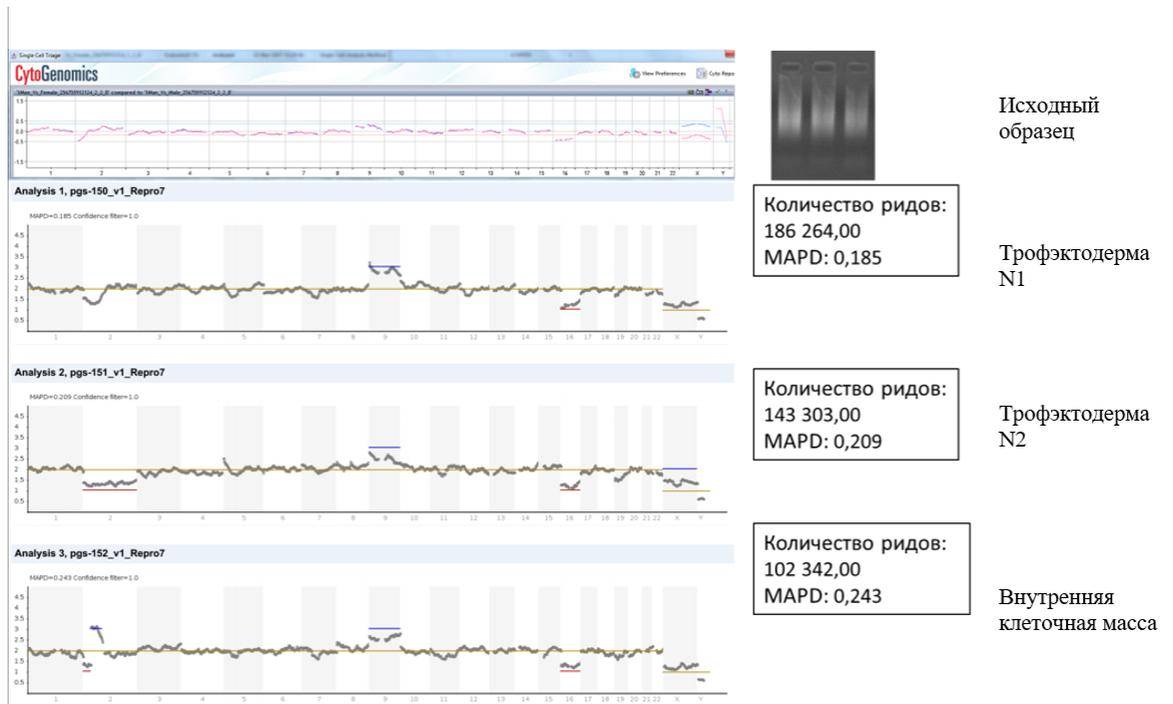


Рисунок 7. Результат aCGH и NGS анализа исходной трофэктодермы, трофэктодермы образца N1, трофэктодермы образца N2 и внутренней клеточной массы эмбриона N 12.

Из рисунка 7 следует, что во всех образцах трофэктодермы эмбриона 1 имелись сходные нарушения, представленные трисомией по 9 и моносомией по 16 хромосоме. Отличия затрагивали только хромосому 2. При использовании aCGH метода установлен дефект терминального участка короткого плеча хромосомы 2, картировать который не удалось. С помощью NGS анализа выявлено: в образце 1 мозаичная форма делеции короткого плеча хромосомы 2 региона 2p25.3p11.2, в образце 2 мозаичная форма всей второй хромосомы и в клетках из внутриклеточной массы мозаичная форма делеции короткого плеча хромосомы 2 региона 2p25.3p11.2, как в образце 1, в

сочетании с дупликацией короткого плеча хромосомы 2 региона 2p22.3p11.2

Рисунок 8 иллюстрирует, что в исходном образце, во 2-ом и 3-ем биоптате трофэктодермы присутствует моносомия по 22хромосоме. Что касается внутренней клеточной массы, помимо моносомии по 22 хромосоме имеется мозаичная форма (70%) трисомии по 10 хромосоме.

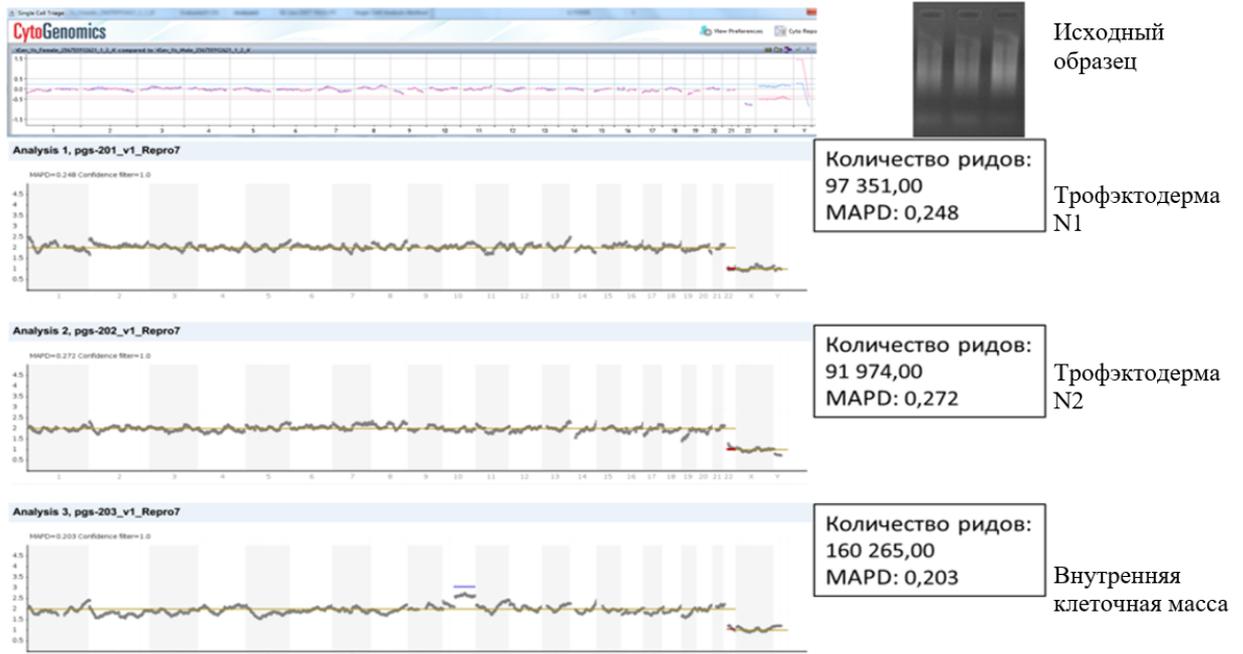


Рисунок 8 Результат aCGH и NGS анализа исходной трофэктодермы, трофэктодермы образца N1, трофэктодермы образца N2 и внутренней клеточной массы эмбриона N 2

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что, хотя клетки эмбрионов, в которых были выявлены анеуплоидии, могут отличаться по своему хромосомному набору, тем не менее рекомендация не переносить такие эмбрионы в рамках программы ЭКО остается справедливой, так как клетки внутренней клеточной массы таких эмбрионов все равно анеуплоидны.

Вместе с тем результаты исследования части трофэктодермы могут быть нерепрезентативны относительно всех ее клеток и внутриклеточной массы. Этот факт следует учитывать при оценке эмбриона, подлежащего переносу.

Наступление беременности после ЭКО с ПГТ не отменяет необходимости пренатальной диагностики женщины при наличии показаний.

### **3.4 STR-анализ как метод детерминации вклада родителей в генетические нарушения эмбриона**

Первый этап исследования заключался в создании коллекции биологического материала. Она была представлена образцами периферической крови потенциальных родителей – 58 супружеских пар и трофэктодермы - 167 эмбрионов. В работе использовали метод aCGH и NGS, амплификацию с помощью PicoPLEX, MDA, WGA-PCR с баркодами. Это позволило провести сравнение результатов, полученных на разных продуктах.

На первом этапе исследования проведено ПГТ-А. Определены эмбрионы с нормальным кариотипом - 65 (38,9%) и анеуплоидные - 102 (61,1%), из которых 28 (27,4%) были представлены мозаичными формами. Материал от эмбрионов с нормальным и мозаичным кариотипом в последующей работе не использовали.

В дальнейшем для анализа хромосом 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 22 и X, которые обнаружили в анеуплоидных наборах эмбрионов, подбирали и синтезировали праймеры с учетом ранее типированных генов-мишеней, ответственных за развитие определенной моногенной патологии. В таблице 14 представлены хромосомы и гены, для которых были подобраны соответствующие праймеры.

Таблица 14 Гены-мишени для анализа хромосом эмбрионов

Хромосома	Гены	Хромосома	Гены
1	GBA, RHD	12	PAH
3	GLB1	13	ATP7B, GJB2
4	PKD2	14	GALC
5	SMN1	15	OCA2, HEXA
6	CYP21, HFE, PKHD1	16	HBA1, HBA2, PKD1, MEFV
7	CFTR, SLC26A4	19	GCDH
9	GALT, FXN	22	ARSA
11	HBB, ATM, TYR	X	DMD, F8, F9, FMR, WAS

Было установлено, что для успешного проведения STR-анализа и определения происхождения анеуплоидий у эмбриона – материнского или отцовского, возможно использование продукта, полученного с помощью всех представленных способов полногеномной амплификации.

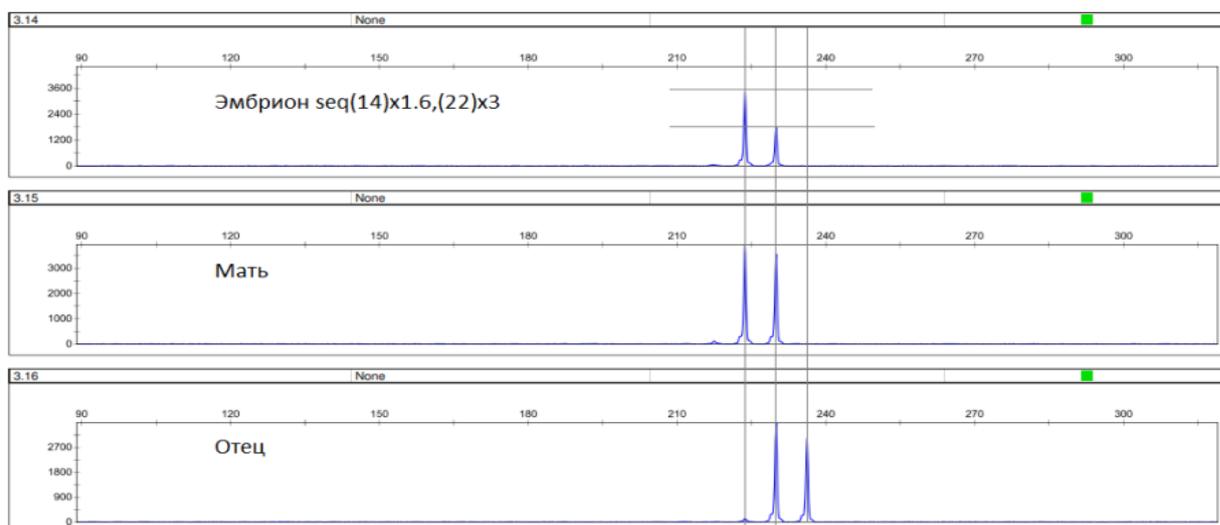


Рисунок 9 Клинический пример материнского вклада в трисомию 22.

На заключительном этапе работы на биоматериале эмбрионов и их родителей выполняли амплификацию с помощью разработанных праймеров. Графики, полученные в результате фрагментного анализа, сопоставляли и на основании сравнения делали вывод о родительском происхождении соответствующих анеуплоидий (рисунок 9 и рисунок 10).

Анализ эмбрионов с помощью фрагментного анализа свидетельствует о возможности определения родительской принадлежности хромосом анеуплоидных эмбрионов. Это имеет большое значение при использовании донорских гамет в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Выбор донорского материала: ооцит/ сперма, целесообразно проводить на основании результатов ПГТ-А: при материнском происхождении анеуплоидий использовать донорские ооциты; при отцовском - донорскую сперму.

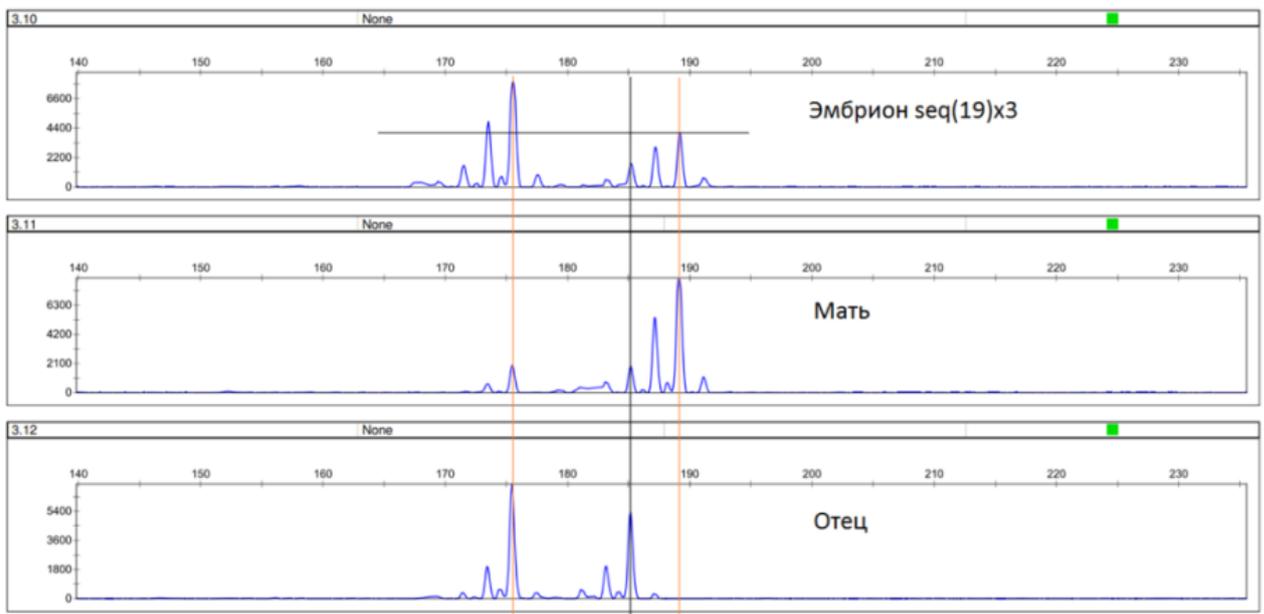


Рисунок 10 Клинический пример отцовского вклада в трисомию 19.

### **3.5 SNP-гаплотипирование для преимплантационной диагностики моногенной патологии**

Обследовано 93 эмбриона от 23 семей с моногенной патологией (обратившихся пациентов, их детей или родственников). Анализ начинали с полногеномной амплификации ДНК. Выбор метода зависел от применяемых в дальнейшем способах тестирования. При использовании SNP-гаплотипирования использовали метод MDA (Quiagen, USA), в остальных случаях - PicoPLEX (Rubicon, USA). Подход к SNP-гаплотипированию был разработан в рамках настоящего исследования. Пробоподготовка представленных образцов включала рестрикцию, лигирование с адаптером, амплификацию, очистку ПЦР-продуктов, фрагментирование, мечение флуорофором, в соответствии с протоколом производителя (Affymetrix Inc., США). После прохождения образцами всех контролей качества, требуемых производителем, полученные образцы наносили на микрочипы высокого разрешения CytoScan 750K. В последующем составляли списки генотипов по представленным на микроматрицах однонуклеотидным полиморфизмам (SNP-гаплотипам).

По данным генотипирования отца, матери и больного ребенка определяли ключевые позиции, по которым имелась возможность однозначно установить, какую из хромосом ребенок унаследовал от одного из родителей. Сравнение генотипов в блоках ключевых позиций заданного размера у больного и эмбриона позволяло определить одинаковые или разные фрагменты хромосом унаследованы от родителей и выбрать эмбрионы, которым заболевание родителей не передалось. Поскольку для определения наследования одновременно исследуется большое количество точек, явление allele drop-out в отдельных точках не влияет на результат.

Из данных, представленных в таблице 15 видно, что эуплоидных

эмбрионов ( $n=55$ ) было значительно меньше, чем всего направленных на тестирование ( $n=93$ ). По данным ПГТ-А в наблюдениях 5,11 и 22 проведение ПГТ-М было нецелесообразно, так как все эмбрионы были анеуплоидными. В остальных 20 наблюдениях, где анализ был продолжен, перенос в полость матки оказался возможен только для 36 эмбрионов. Из них у 19 мутации отсутствовали и 17 явились гетерозиготными носителями.

В 14 наблюдениях из 23 (таблица 15) ПГТ-А было выполнено с использованием aCGH и в 9 с применением NGS. Полученные данные свидетельствовали, что оба метода были информативны для выявления анеуплоидий в эмбрионах. Вместе с тем, метод NGS позволяет одновременно получать информацию об уровне хромосомного мозаицизма.

Результаты работы свидетельствуют, что перед ПГТ-М целесообразно выполнить ПГТ-А, так как существует риск наличия у эмбрионов анеуплоидий. Проведение ПГТ-М без ПГТ-А не гарантирует перенос эмбрионов без хромосомной патологии.

Таблица 15 Результаты комплексного применения ПГТ-А и ПГТ-М.

N	Диагноз	Получили эмбрионов	PGT-A	Эуплоидных	ПГТ-М		Пригодных для переноса после PGT
					Метод прямой диагностики	Метод не прямой диагностики	
1	ахондроплазия	6	NGS	3	секвенирование по Сэнгеру	SNP-гаплотипирование	2
2	галактоземия	10	NGS	7	секвенирование по Сэнгеру	SNP-гаплотипирование	6 (из них 3 носители)
3	хорея Гентингтона	9	NGS	2	Фрагментный анализ	STR-анализ	0
4	болезнь Верднига - Гоффмана	6	aCGH	4	секвенирование по Сэнгеру	STR-анализ	3 (все носители)
5	невральная амиотрофия Шарко-Мари-Тута 1А	1	aGCH	0	не проводили	не проводили	0
6	синдром Луи-Бар, атаксия телеангиэктазия	2	NGS	2	секвенирование по Сэнгеру	SNP-гаплотипирование	2 (1 носитель)
7	экзостозная болезнь	5	NGS	2	секвенирование по Сэнгеру	STR-анализ	0
8	муковисцидоз	6	NGS	4	ПЦР	SNP-гаплотипирование	1 (носитель)
9	полипоз толстого кишечника аутосомно-доминантный	2	NGS	2	секвенирование по Сэнгеру	SNP-гаплотипирование	1

N	Диагноз	Получили эмбрионов	PGT-A	Эуплоидных	ПГТ-М		Пригодных для переноса после PGT
					Метод прямой диагностики	Метод не прямой диагностики	
10	муковисцидоз	4	aCGH	2	ПЦР	STR-анализ	1 (носитель)
11	муковисцидоз	1	NGS	0	не проводили	не проводили	0
12	муковисцидоз	7	aCGH	4	ПЦР	STR-анализ	4 (2 носители)
13	муковисцидоз	3	aCGH	3	ПЦР	STR-анализ	2
14	муковисцидоз	5	aCGH	3	ПЦР	STR-анализ	3 (2 носителя)
15	болезнь Верднига - Гоффмана	1	aCGH	1	секвенирование по Сэнгеру	STR-анализ	0
16	мукополисахаридоз III типа	2	aCGH	2	секвенирование по Сэнгеру	STR-анализ	2 (оба носители)
17	X-сцепленный иммунодефицит	6	aCGH	5	секвенирование по Сэнгеру	не проводили	5
18	поликистоз почек аутосомно-доминантный	3	aCGH	1	секвенирование по Сэнгеру	STR-анализ	1
19	пояснично-конечностная мышечная дистрофия типа 2a	2	aCGH	2	секвенирование по Сэнгеру	STR-анализ	1
20	болезнь Краббе	2	aCGH	2	секвенирование по Сэнгеру	STR-анализ	2 (носители)
21	болезнь Краббе	3	aCGH	2	секвенирование по Сэнгеру	SNP-гаплотипирование	1(носитель)
22	альфа-талассемия	3	aCGH	0	не проводили	не проводили	0
23	тугоухость	4	NGS	2	ПЦР	STR-анализ	1

N	Диагноз	Получили эмбрионов	PGT-A	Эуплоидных	ПГТ-М		Пригодных для переноса после PGT
					Метод прямой диагностики	Метод непрямой диагностики	
	Итого:	93		55			38 (18 носителей)

### **3.6 Молекулярно-генетические исследования выявления дополнительных биомаркеров взаимосвязи с частотой анеуплоидий**

Изучено влияние уровней мтДНК на возможность имплантации при исследовании трофэктодермы 106 эмбрионов и 454 ооцит-кумулюсных комплексов.

Определение копийности мтДНК в трофэктодерме выполняли с использованием метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). В реакции использовали специально разработанные олигонуклеотиды и TaqMan-пробы для амплификации и количественного определения специфических фрагментов мтДНК (ген MT-ND2-mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2 и ген MT-ND4-mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 4). Нормировка осуществлялась на геномную ДНК (ген LTC4S-leukotriene C4 synthase). Оценку уровня мтДНК сочетали с преимплантационным генетическим тестированием на анеуплоидии (ПГТ-А) с помощью сравнительной геномной гибридизации на чипе (aCGH).

Из 106 обследованных эмбрионов у 38 была выявлен патологический кариотип и у 68 – нормальный. При оценке уровня мтДНК было выявлено статистически значимое повышение его у анеуплоидных по сравнению с эуплоидными эмбрионами ( $p=0,003$ ). На рисунке 11 представлен средний уровень мтДНК у эмбрионов с нормальным и патологическим хромосомным набором.

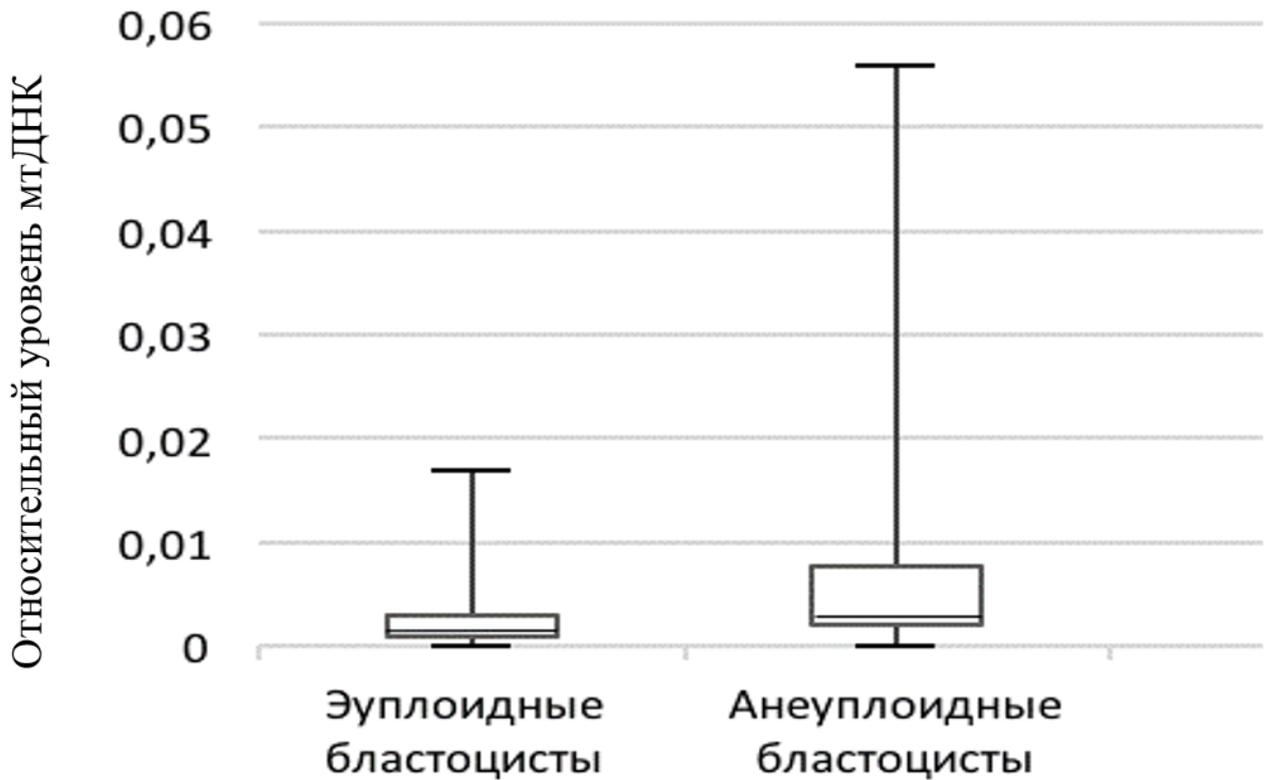


Рисунок 11 Уровень копийности мтДНК в трофэктодерме у эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов.

Проведенный ROC анализ (ROC анализ - выбор оптимального соотношения чувствительности и специфичности диагностического метода) позволил установить пороговое значение уровня мтДНК, составившее 0,04 о.е. превышение которого прогнозировало неудачу имплантации с чувствительностью 76,8% и специфичностью 74,9%. Площадь под ROC-кривой составила 0,823 (95% ДИ, 0710-0,935), что свидетельствует о высоком прогностическом значении. Имплантация не наступала даже при переносе эуплоидных бластоцист, если уровень мтДНК превышал установленное пороговое значение.

Установлено также, что копийность мтДНК, не зависимо от кариотипа эмбрионов, увеличивалась с возрастом женщин ( $p=0,0038$ ). На рисунке 12 представлены эти параметры.

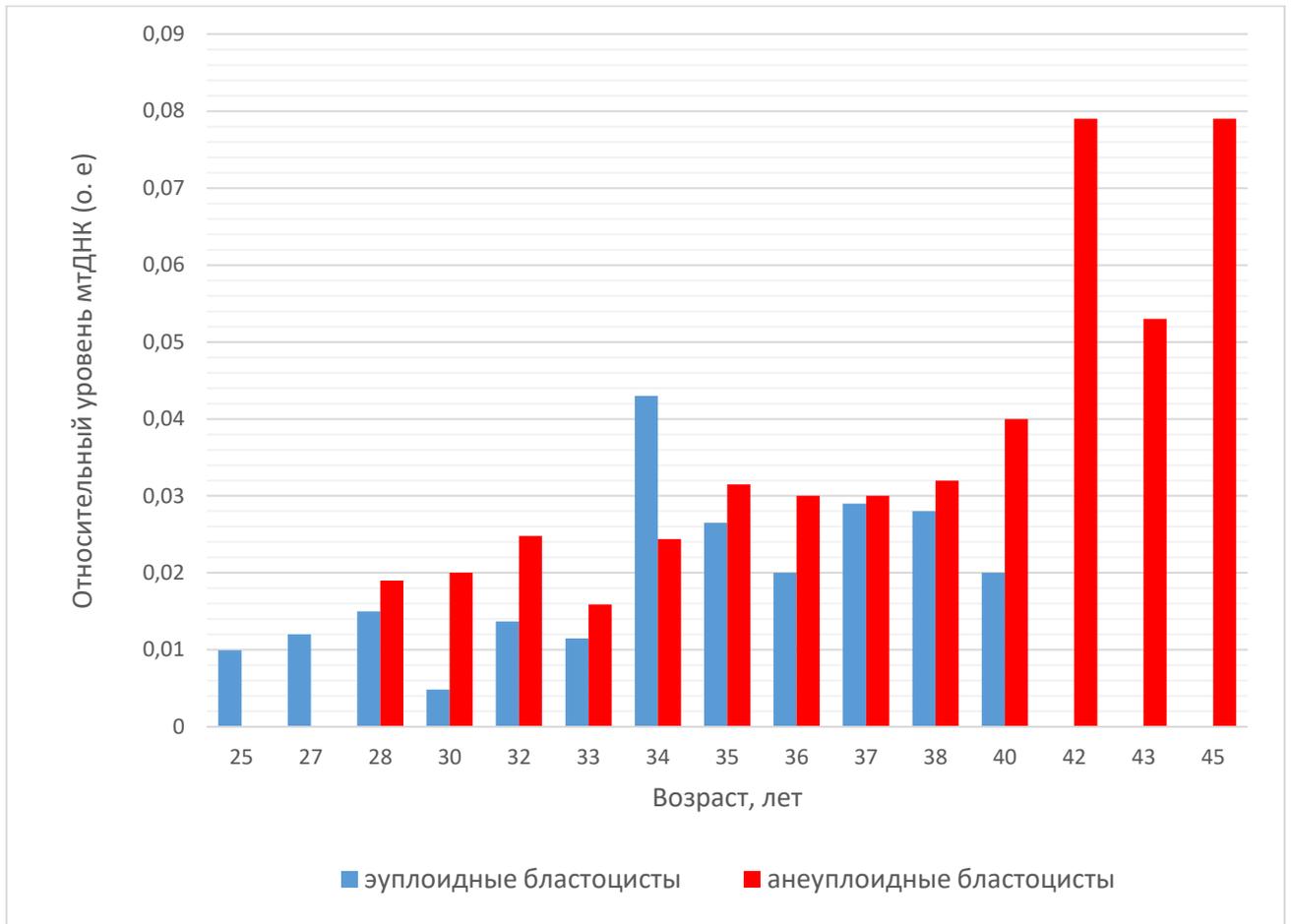


Рисунок 12. Уровень мтДНК при нормальном и патологическом кариотипе эмбриона с учетом возраста женщины.

Показатели копийности мтДНК оценивали не только в трофэктодерме бластоцист, но и в кумулюсных клетках. Для оценки показателя копийности митохондриальной ДНК (мтДНК) в кумулюсных клетках пациенток было исследовано 454 ооцит-кумулюсных комплексов 67 пациенток с бесплодием в возрасте 35-45 лет. Относительная количественная оценка копийности мтДНК проводилась с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. В реакции использовали специально разработанные олигонуклеотиды и TaqMan-пробы для амплификации и количественного определения специфических фрагментов мтДНК (ген MT-ND2-mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2 и ген MT-ND4-mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 4).

Нормировка осуществлялась на геномную ДНК (ген LTC4S-leukotriene C4 synthase). В результате проведенного анализа была выявлена отрицательная корреляция между средним уровнем мтДНК в кумулюсных клетках и возрастом пациенток ( $p=0,008$ ): с увеличением возраста отмечалось снижение копийности мтДНК в кумулюсных клетках (рисунок 13).

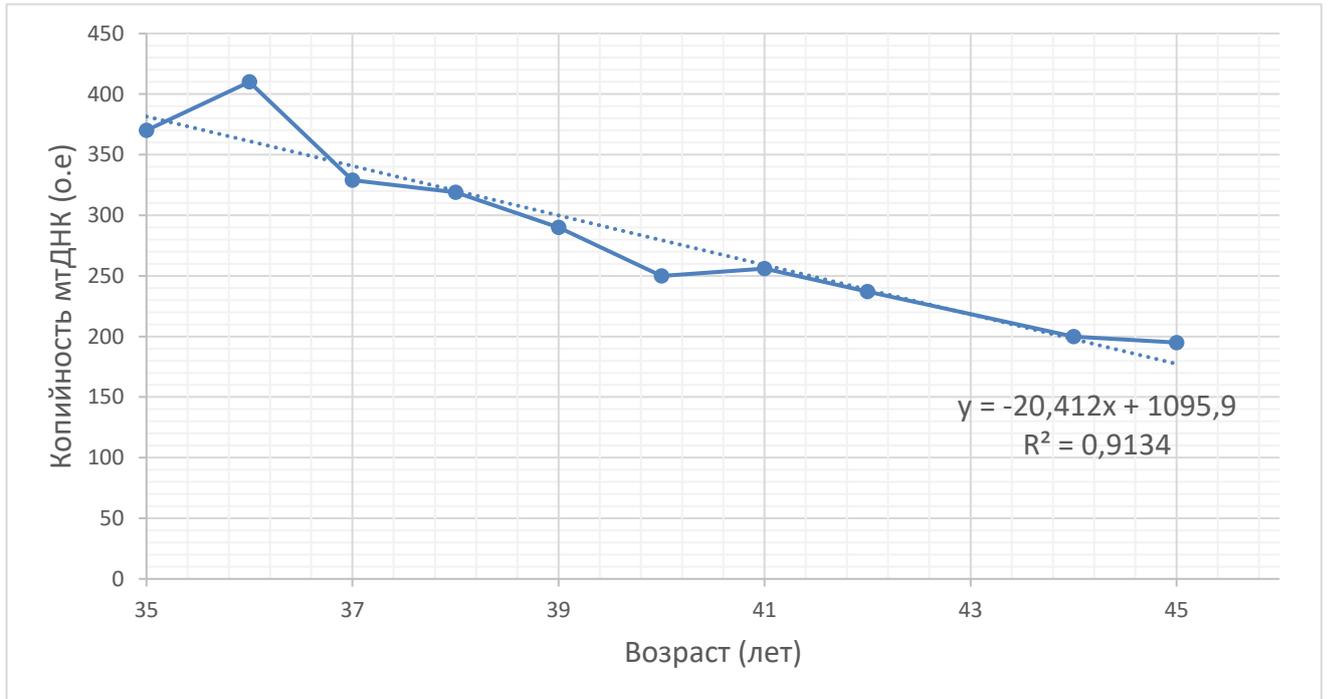


Рисунок 13 Изменение уровней мтДНК в кумулюсных клетках с увеличением возраста пациенток.

Причем возраст 39 лет явился пороговым, при котором копийность мтДНК в кумулюсных клетках снижалась в 1,5 раза по сравнению с пациентками в возрастном диапазоне 35-38 лет.

С целью изучения влияния фрагментации ДНК сперматозоидов на развитие анеуплоидий были обследованы эмбрионы 147 супружеских пар из которых в 66 парах у мужчин было количество морфологически нормальных сперматозоидов менее 4%-основная группа и в 81 паре – свыше 4%: группа сравнения. Исследование хромосомного набора 367 эмбрионов проведено методом аСГН.

Установлена статистически значимая зависимость между уровнем морфологически нормальных сперматозоидов мужчины и хромосомным набором

эмбрионов (таблица 16).

Таблица 16. Частота (%) аномалий числа и структуры хромосом эмбрионов при нормальном и низком содержании морфологически нормальных сперматозоидов у мужчин.

Хромосомный набор эмбриона	Уровень морфологически нормальных сперматозоидов		P МУУ-тест
	менее 4%	более 4%	
нормальный	28%	58%	0,0003
трисомии по аутосомам	49%	26%	0,0001
моносомии по аутосомам	46%	26%	0,0004
трисомии по половым хромосомам	72%	35%	0,0436
моносомии по половым хромосомам	12%	13%	0,485
делеции и дупликации	16%	66%	0,026

Из таблицы 16 следует, что при содержании морфологически нормальных сперматозоидов менее 4%, частота эмбрионов с нормальным хромосомным набором снижается до 27,83%. У этих мужчин статистически значимое увеличение частоты аномального кариотипа эмбриона относилось к трисомиям по аутосомам - 48,57%, трисомиям по половым хромосомам - 7%, моносомиям по аутосомам – 46,29%, а также к делециям и дупликациям - 16,03% ( $p < 0,001$  -  $p < 0,05$ ). В литературе имеются данные, что среди мужчин со сниженным

содержанием морфологически нормальных сперматозоидов повышена частота сперматозоидов с дисомией по половым хромосомам, следствием чего является формирование эмбрионов с трисомией по половым хромосомам [55].

Для определения частоты анеуплоидий у эмбрионов в парах с повышенным и нормальным уровнем фрагментации ДНК ядра сперматозоидов обследовано 170 супружеских пар. ПГТ-А у 425 эмбрионов осуществляли с использованием aCGH метода. Результаты исследования представлены в таблице 17.

Таблица 17 Кариотипы эмбрионов при нормальном и повышенном уровне фрагментации ДНК сперматозоидов.

Хромосомный набор эмбриона	Уровень фрагментации ДНК-сперматозоидов		P T-тест	P МУУ-тест
	менее 15%	более 15%		
нормальный	66,17	47,96	0,0623	0,0275
трисомии по аутосомам	18,95	29,11	0,218	0,2736
моносомии по аутосомам	16,72	29,51	0,0886	0,113
трисомии по половым хромосомам	4,6	8,54	0,5941	0,3134
моносомии по половым хромосомам	4,95	1,22	0,3133	0,1698
делеции и дупликации	5,39	35,89	0,0011	0,0116

При изучении хромосомного набора эмбрионов установлено достоверное снижение частоты нормального кариотипа при повышенном уровне фрагментации ДНК-сперматозоидов: 47,96% при фрагментации ДНК более 15%, 66,17% при уровне фрагментации менее 15% ( $p < 0,02$ ). Проведенный анализ частоты трисомий и моносомий по аутосомам и половым хромосомам не выявил статистически значимых различий между группами с нормальным и повышенным

уровнем фрагментации ДНК. Обнаружено достоверное увеличение частоты делеций и дупликаций у эмбрионов от мужчин с повышенной фрагментацией ДНК сперматозоидов - 35,89% по сравнению с 5,39% при нормальном уровне ( $p < 0,001$ ).

Полученные данные относительно повышения частоты хромосомных нарушений у эмбрионов от мужчин со сниженным содержанием морфологически нормальных сперматозоидов и повышенным уровнем у них фрагментации ДНК, позволяют сделать предположение о вкладе повреждений в структуре ДНК сперматозоидов в генетический материал эмбриона, расширяют показания к ПГТ-А для повышения эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий. При бесплодии, обусловленном мужским фактором, показано проведение ПГТ-А для анализа кариотипа эмбрионов в связи с повышенной частотой выявления у них анеуплоидий.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 4.1 Определение оптимального материала для преимплантационного тестирования

Результаты работы свидетельствуют, что для проведения ПГТ оптимальным является исследование нескольких клеток, а не одной. Это означает, что тестирование трофэктодермы эмбрионов на стадии бластоцисты является более предпочтительным, чем исследование единичных бластомеров. Данное обстоятельство обуславливается, во-первых, тем, что получить результаты полногеномной амплификации в случае изучения бластомеров не удалось в 9,1% случаев, тогда как отсутствие продуктов амплификации в случае изучения трофэктодермы наблюдали лишь в 1,7% случаев. Данное обстоятельство подтверждается данными других авторов. Так в работе E.Forman и др. [35] получить результаты для бластомеров не удалось в 16% случаев, а для трофэктодермы в 5%..

Во-вторых, проведение ПГТ на трофэктодерме позволяет изучать такое важное биологическое явление, как хромосомный мозаицизм. Исследование нескольких клеток эмбриона повышает информативность метода в целом. В данном исследовании мозаичный генотип эмбрионов наблюдался в 6,6% случаев. В статье Coll и др. описано, что частота мозаичных эмбрионов в группе, где проводилась биопсия трофэктодермы, составляла 4% [25].

В-третьих, анеуплоидии в эмбрионах на стадии бластоцисты наблюдались нами значительно реже, чем на стадии эмбриона третьих суток развития (45,8% против 75,4%). По данным Adler и др. [18] анеуплоидии были выявлены в 53% образцов трофэктдермы и в 69% бластомеров. Таким образом при исследовании

трофэктодермы уменьшается количество проводимых для данного пациента исследований при поиске эуплоидного эмбриона.

#### **4.2 Оценка особенностей применения методов aCGH и NGS для выявления анеуплоидий эмбрионов**

Сравнение применения технологий aCGH и NGS проводилось на образцах трофэктодермы с использованием двух разных подходов к полногеномной гибридизации: MDA (Repli-G) и PicoPLEX (SurePlex). Во всех наблюдениях удалось установить молекулярные кариотипы клеток трофэктодермы, отрицательных результатов не наблюдали. Расхождения в результатах, полученных с помощью aCGH и NGS составили 5,2% (2 случая из 38 наблюдений). В работах зарубежных авторов, посвященных сравнительному анализу этих методов, различия между результатами, полученными разными методами, составляли от 0 до 0,8%. [33, 58, 105]. Данные отличия, вероятно, могут быть обусловлены недостаточной эффективностью мечения продуктов полногеномной амплификации перед их нанесением на чип, что может являться аргументом в пользу NGS.

В нашей работе, в отличие от опубликованных ранее работ, для полногеномной амплификации применяли не только PicoPLEX (SurePlex), но и MDA (Repli-G). [33, 58, 105]. В настоящее время данные технологии являются самыми распространенными методами для полногеномной амплификации наряду с MALBAC. В работе Deleue и др. [28] было показано, что амплификация с помощью MALBAC не настолько равномерная, как при использовании WGA-PCR

В работе Rey и др. [78] доказано, что амплификация с помощью MDA гораздо более равномерная, чем при использовании SurePlex и MALBAC, MDA (RepliG) показала лучший результат. Данное обстоятельство обуславливает более полную представленность исследуемого генома в продуктах полногеномной амплификации, снижая вероятность выпадения аллеля (ADO, allele drop-out). Вместе с тем противоречивые результаты применения MDA описаны в работе Li и др. [61]. В любом случае применение метода MDA предпочтительнее других полногеномных методов в связи с тем, что после MDA возможно качественное проведение хромосомного микроматричного анализа с SNP-анализом, что имеет решающее значение для проведения SNP-гаплотипирования.

В процессе настоящего исследования было установлено, что проведение MDA предпочтительнее, чем PicoPLEX, из-за более значительного отношения сигнал/шум при измерении флуоресценции на биочипе. Увеличение этого значения упрощает интерпретацию результатов, делает ее более объективной и надежной. Другое немаловажное обстоятельство предпочтения MDA перед PicoPLEX - более полная представленность исследуемого генома в виде продуктов амплификации, т. е. снижение вероятности выпадения аллеля (allele dropout, ADO). Этот факт может иметь решающее значение в том случае, если продукты амплификации должны использоваться в дальнейшем, например, при проведении преимплантационной генетической диагностики.

Таким образом, различия в получаемых результатах могут объясняться как более высокой разрешающей способностью метода NGS, так и подходами к их интерпретации, а также использованием разных наборов для полногеномной амплификации.

### 4.3 Оценка влияния мозаицизма при преимплантационном обследовании на полученные результаты

Согласно данным литературы [23, 76] анеуплоидные клетки не концентрируются в каком-то одном регионе бластоцисты: трофэктодерме или внутренней клеточной массе. Поэтому результаты ПГТ, полученные на образцах трофэктодермы, отражают картину возможных хромосомных нарушений во внутренней клеточной массе. Вместе с тем собственные материалы показывают, что результаты исследования части трофэктодермы могут быть нерепрезентативны относительно всех ее клеток и внутриклеточной массы. Мозаицизм был выявлен в 10 исследованных эмбрионах из 17, что составило 59%. Сравнение результатов, полученных из второго, третьего фрагмента трофэктодермы, а также внутренней клеточной массы, проводившихся только при помощи NGS, показало наличие мозаицизма уже в 7 эмбрионах, что составило 41%. Расхождение в результатах, по-видимому, обусловлено техническими ограничениями методов. Собственные наблюдения свидетельствуют, что использование aCGH для выявления мозаицизма субъективно и не надежно. Вероятность постановки ложного заключения из-за несоответствия результатов тестирования образца трофэктодермы внутренней клеточной массе составила 6%. Согласно данным Caralbo A. и Porovic M. [23, 76], такая вероятность составляет порядка 4%. Этот факт следует учитывать при оценке эмбриона, подлежащего переносу и при наступлении беременности решать вопрос о целесообразности инвазивной пренатальной диагностики.

#### **4.4 Разработка методов определения родительской принадлежности анеуплоидий эмбриона**

Несмотря на то, что анеуплоидии в эмбрионах стали выявлять еще в XX веке, оставался открытым вопрос о природе их возникновения. Не было ясно есть ли связь с наличием и характером анеуплоидий с их происхождением: материнским или отцовским. Относительно недавно источник возникновения анеуплоидий научились определять. Для этого можно использовать разные методы. Первые данные по этому вопросу основывались на изучении генотипов полярных телец, бластомеров и трофэктодермы с помощью aCGH [39]. В этой работе Fragouli и др. при изучении генотипа полярных телец ооцитов выявили, что только в 26% исследуемых ооцитов отсутствовали анеуплоидии. Среди всех анеуплоидных ооцитов 30% анеуплоидий были связаны с ошибками мейоза I, 43% с ошибками мейоза II и 27% содержали ошибки как мейоза I, так и мейоза II. Данная работа свидетельствует о значительной доле анеуплоидий материнского происхождения, связанных с мейозом [39].

В работе Sills и др. [86] применялось генотипирование эмбрионов с помощью SNP-чипов. Если при использовании aCGH можно сделать выводы о родительском происхождении косвенным путем, то применение SNP-чипов является прямым методом диагностики. Было показано, что в эмбрионах, полученных от доноров ооцитов, анеуплоидии исключительно материнского происхождения были выявлены в 31%, мужского происхождения в 12%, мужского и женского одновременно в 57% от всех анеуплоидных эмбрионов [86]. Применение SNP-чипов является надежным инструментом выявления происхождения анеуплоидий. Вместе с тем, при использовании SNP-чипов значительно возрастает стоимость исследования.

Решить эту задачу можно с помощью других методов, в частности фрагментного анализа STR-маркеров. Так, в работе Wang и др. 2014 [101]

фрагментный анализ STR-маркеров хромосом 1, 19, 21, 22 и X применялся для подтверждения результатов ПГТ-А, полученных на бластомерах с помощью NGS. В работе Соловьевой и др. [15] фрагментный анализ STR-маркеров применялся в рамках подготовительных этапов преимплантационного тестирования 9 моногенных заболеваний.

Целью представленных выше работ являлось изучение происхождения анеуплоидий, но не рутинное применение в клинической практике. В настоящем исследовании был разработан и использован подход, заключающийся в фрагментном анализе STR-маркеров хромосом эмбрионов. Для этого были подобраны и синтезированы уникальные праймеры, позволяющие проведение анализа практически всех хромосом человека. Универсальность данного подхода позволяет использовать его как для проведения изучения происхождения анеуплоидий, так и с целью ПГТ-М, что имеет важное клиническое значение. Применение данного подхода может иметь большое значение при использовании донорских гамет в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Выбор донорского материала: ооцит/ сперма, целесообразно проводить на основании результатов ПГТ-А: при материнском происхождении анеуплоидий использовать донорские ооциты; при отцовском - донорскую сперму. Однако данные выводы можно будет делать лишь после накопления соответствующего экспериментального материала.

#### **4.5 Разработка технологии и алгоритма применения SNP-гаплотипирования для детекции моногенной патологии с использованием чипов Affymetrix**

Наиболее распространенными методами, применяющимися на сегодняшний

день для детекции моногенной патологии в эмбрионах, являются ПЦР, секвенирование и фрагментный анализ. Данные подходы наиболее широко используются и в отечественной клинической практике [7, 9]

В рамках настоящей работы было разработано и внедрено в клиническую практику ПГТ-М на основании гаплотипирования ДНК эмбрионов, родителей и больных детей с помощью SNP. Уникальной особенностью данного подхода явилось одновременное использование MDA для полногеномной амплификации, чипов Affymetrix CytoScan™ 750K и специально разработанного для этой цели программного обеспечения.

Определение генотипов отца, матери и больного ребенка позволяло устанавливать информативные SNP, которые однозначно указывали, какой именно фрагмент хромосомы с учетом прохождения кроссинговера ребенок унаследовал от одного из родителей. Сравнение полученной информации у больного и исследуемых эмбрионов позволяло выбрать те эмбрионы, которым заболевание родителей не передалось.

Данный подход упрощает проведение ПГТ-М и делает его более быстрым, надежным и достоверным. Применение разработанного метода особенно оправдано в случаях диагностики моногенных заболеваний с исключительной редкостью, когда в лаборатории отсутствуют необходимые реактивы, в частности праймеры для проведения STR-анализа и требуется их заказ, синтез, и отработка условий проведения ПЦР и фрагментного анализа. Ускорение проведения ПГТ-М в таком случае позволяет дать семье с моногенной патологией больше шансов на успешный исход программы ЭКО с ПГТ-М, потенциально увеличивая число возможных попыток ЭКО.

В литературе имеются сведения о применении гаплотипирования с помощью SNP для построения карты наследования хромосом с целью проведения ПГТ (Karyomapping A.Handyside [48], Haplarithmisis M. Z. Esteki [107], OnePGT H.Masset [65], Haploseek Daniel Backenroth [20]). Однако для этой цели

используются иные технологические платформы (преимущественно Illumina), методы амплификации и алгоритмы обсчета полученных данных. Существуют также данные о применении метода масс-спектрометрии для детекции SNP, однако в настоящее время они не получили широкого распространения [4]

#### **4.6 Анализ возможности влияния уровней мтДНК в кумулюсных клетках и трофэктодерме на частоту анеуплоидий эмбрионов**

Предполагается, что способность ооцита к оплодотворению, как и способность поддерживать развитие эмбриона, зависят от содержания АТФ в ооците [41, 62]. Митохондрии являются клеточными органеллами, ответственными за синтез АТФ путем окислительного фосфорилирования. Отличительной особенностью митохондрий от других клеточных органелл является наличие митохондриальной ДНК (мтДНК). В литературе имеются сведения о взаимосвязи между потенциалом имплантации и содержанием мтДНК в трофэктодерме бластоцист и в кумулюсных клетках ооцитов [77, 102].

С целью расширения спектра маркеров, оказывающих влияние на репродуктивный потенциал эмбрионов, была разработана техника определения копийности мтДНК в трофэктодерме бластоцист и в кумулюсных клетках с использованием ПЦР и специально созданных олигонуклеотидов. Статистически значимое повышение уровня мтДНК было выявлено в трофэктодерме бластоцист анеуплоидных эмбрионов. Установлено, что вне зависимости от кариотипа эмбриона уровень мтДНК возрастает с увеличением возраста женщины. Вероятно, бластоцисты с повышенными уровнями мтДНК испытывают некоторую форму клеточного стресса и требуют дополнительной энергии или формируется компенсаторный механизм, в связи с нарушением функционирования митохондрий, из-за накопления мутаций в митохондриальном

геноме. В литературе по этому вопросу нет единого мнения. В работах Fragouli E. et al. [41, 42] и Ravichandran K. et al. [77] отмечено увеличение уровня мтДНК у пациенток позднего репродуктивного возраста. Вместе с тем Santos M. et al. [62] подобной зависимости не выявили, что может быть обусловлено ограниченным возрастным диапазоном исследуемой авторами выборки.

На животных моделях (ооцитах мышей, свиней) было доказано, что ооциты, которые содержали большее количество мтДНК, оплодотворялись успешнее, чем ооциты со сниженной копийностью мтДНК [30]. Однако определение уровня мтДНК ооцитов человека по этическим соображениям невозможно. В связи с этим проводят исследования клеток кумулюса, что считается одним из лучших неинвазивных подходов для оценки метаболических процессов, лежащих в основе качества ооцитов и потенциала развития эмбрионов. Митохондрии клеток кумулюса являются центральными агентами энергетических метаболических путей, непосредственно участвуют в становлении ооцитов во время оогенеза [27]. По данным литературы существует взаимосвязь между дисфункцией митохондриальной ДНК (мтДНК) и снижением качества ооцитов с увеличением возраста женщин [63]. В результате проведенного молекулярного анализа уровня мтДНК в клетках кумулюса было выявлено его снижение с увеличением возраста женщины, что согласуется с данными литературы [21]. Вероятно, эта отрицательная корреляция отражает возрастное снижение как качества, так и количества ооцитов.

Таким образом, наступление имплантации зависит не только от кариотипа эмбриона, но и от уровня мтДНК.

В происхождении анеуплоидных эмбрионов имеют значения не только нарушения в яйцеклетке, но и в сперматозоиде [3]. В качестве одного из вероятных маркеров было решено проанализировать влияние морфологии и ДНК сперматозоидов на частоту анеуплоидий эмбрионов. В работе установлено повышение частоты хромосомных нарушений у эмбрионов среди мужчин со

сниженным содержанием морфологически нормальных сперматозоидов и повышенным уровнем их ДНК – фрагментации.

Данные, полученные в настоящем исследовании, следует учитывать в ходе подготовки к применению вспомогательных репродуктивных технологий.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие вспомогательных репродуктивных технологий и поиск возможностей повышения эффективности ЭКО привели к широкому распространению преимплантационного генетического тестирования. Вместе с тем возросло и количество методических вопросов, касающихся особенностей проведения ПГТ (в частности ПГТ-А). Для их решения было необходимо определить какой биологический материал (полярные тельца, трофэктодерма, бластомеры) наиболее целесообразно использовать для генетического анализа; какие методы проведения этого анализа являются наиболее информативными, надежными, производительными; влияет ли наличие феномена хромосомного мозаицизма в эмбрионах на точность получаемых результатов; оценить значение мужского фактора на развитие анеуплоидий эмбрионов; по возможности найти другие кроме анеуплоидий маркеры и предикторы развития эмбрионов. Отдельной задачей являлась и является разработка, внедрение, оптимизация и применение ПГТ-М в связи с большой трудоемкостью тестирования эмбрионов на моногенные заболевания, высокой продолжительностью тестирования и проведением подтверждающей диагностики с целью уменьшения рисков ложноположительных и ложноотрицательных результатов к минимуму.

В ходе выполнения нашей работы впервые в России проведен перенос эмбриона в полость матки после преимплантационного генетического тестирования методом аCGH на платформе Agilent. В дальнейшем также впервые в России проведена оценка возможностей использования методов NGS и аCGH в качестве преимплантационного генетического скрининга (ПГТ-А), в том числе и с помощью разных методов амплификации – PicoPLEX и MDA.

С целью оценки вклада родителей на возникновение анеуплоидий эмбрионов нами была разработана методика проведения фрагментного STR-анализа с использованием различных продуктов полногеномной амплификации

для генотипирования эмбрионов. Было установлено, что одновременно с генотипированием эмбрионов можно осуществлять преимплантационное генетическое тестирование и анеуплоидий, и моногенной патологии без необходимости повторного забора материала для исследования.

Обнаружено, что уровень мтДНК можно использовать в качестве маркера развития эмбриона, разработаны соответствующие методики его измерения.

Выявлено влияние мужского фактора на развитие анеуплоидий эмбрионов. Установлено, при снижении морфологически нормальных форм сперматозоидов, увеличении уровня фрагментации ДНК сперматозоидов повышаются частоты анеуплоидий у эмбрионов, что свидетельствует о вкладе повреждений структуры ДНК сперматозоидов в генетический материал эмбриона.

С целью проведения ПГТ-М был разработан и внедрен в практику метод SNP-гаплотипирования, основанный на анализе однонуклеотидных полиморфизмов с использованием микрочипов высокого разрешения Affymetrix CytoScan 750K. Определен оптимальный метод амплификации для успешного проведения ПГТ-М данным методом (MDA), разработаны соответствующие алгоритмы анализа полученных данных.

## ВЫВОДЫ

1. Материалом, оптимальным для ПГТ, является трофэктодерма бластоцисты. Использование трофэктодермы снижает вероятность отсутствия продуктов полногеномной амплификации с 9,1% до 1,7%, а также позволяет определять хромосомный мозаицизм.

2. Приоритетным методом обследования эмбрионов является NGS с MDA амплификацией. Такой подход позволяет снизить MAPD с  $0,19 \pm 0,04$  до  $0,12 \pm 0,03$ .

3. Хромосомный набор разных участков трофэктодермы и внутренней клеточной массы отличается. Метод NGS позволяет выявить и количественно оценить хромосомный мозаицизм в пределах одного образца. Мозаицизм при преимплантационном обследовании влияет на точность получаемых данных, однако вероятность ложноположительных результатов не превышает 6%.

4. Разработан метод определения вклада родителей в происхождение анеуплоидий эмбрионов с помощью STR-маркеров. Это имеет решающее значение при выборе материала донора в программах вспомогательных репродуктивных технологий. При материнском происхождении анеуплоидий следует использовать донорские ооциты, при отцовском - донорскую сперму.

5. Разработана методика SNP-гаплотипирования с использованием чипов Cytoscan, амплификации MDA и собственного программного обеспечения.

6. Преимплантационное генетическое тестирование моногенных заболеваний должно включать обследование на наличие анеуплоидий эмбриона для исключения хромосомной патологии, так как 41% обследованных в рамках ПГТ-М эмбрионов являются анеуплоидными.

7. Уровень копийности мтДНК в трофэктодерме статистически значимо возрастает у анеуплоидных эмбрионов по сравнению с эуплоидными ( $p=0,003$ ), не

зависимо от кариотипа эмбрионов увеличивается с возрастом женщин ( $p=0,0038$ ). В кумулюсных клетках корреляция между уровнем мтДНК и возрастом пациенток отрицательная ( $p=0,008$ ).

8. Частота эуплоидных эмбрионов статистически значимо ( $p<0,001$ ) снижается: с 58% до 28% у мужчин с содержанием морфологически нормальных сперматозоидов менее 4%, с 66% до 48% у мужчин с фрагментацией ДНК сперматозоидов более 15%. При бесплодии, обусловленном мужским фактором, показано проведение ПГТ-А.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Выявление хромосомной патологии эмбриона следует выполнять в трофэктодерме с использованием метода NGS и амплификации методом MDA.

Мозаицизм эмбриона, обнаруженный при ПГТ-А, необходимо учитывать при его выборе для переноса в полость матки.

Разработанный фрагментный STR-анализ, который позволяет определить родительскую принадлежность анеуплоидии, целесообразно проводить при планировании использования донорских гамет в программах ВРТ. При определении у эмбриона анеуплоидии материнского происхождения – использовать донорские ооциты, при отцовском – донорскую сперму.

Уровни копийности мтДНК и ооцит-кумулюсных комплексов, как и уровни фрагментации ДНК-сперматозоидов, влияют на частоту анеуплоидий эмбрионов в связи с чем определение этих уровней следует включать в комплекс обследования пациентов для программ ВРТ.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Результаты работы свидетельствуют, что частота мозаицизма в одном-двух образцах биопсии трофэктодермы не всегда отражает частоту мозаицизма всего эмбриона; биопсия части трофэктодермы может быть нерепрезентативной относительно всей внутриклеточной массы. Следует продолжить поиск новых биологических материалов для анализа кариотипа эмбриона, повышения точности диагностики у них хромосомных аномалий.

Несмотря на то, что была разработана методика выявления родительского происхождения анеуплоидий практически для всех хромосом, в ряде случаев интерпретация результатов была неоднозначной, что требует продолжения исследований в этом направлении.

В процессе исследования определены такие предикторы имплантационного потенциала эмбриона как уровень митохондриальной ДНК в трофэктодермы бластоцист и ооцит-кумулюсных комплексах, количество морфологически нормальных сперматозоидов и частота фрагментации их ДНК. Планируется расширить спектр маркеров, влияющих на имплантацию эмбрионов.

## СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии.

мтДНК – митохондриальная ДНК.

ПГД – преимплантационная генетическая диагностика.

ПГС – преимплантационный генетический скрининг.

ПГТ-А – преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии.

ПГТ-М – преимплантационное генетическое тестирование моногенных заболеваний.

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

aCGH (array comparative genomic hybridization) – сравнительная геномная гибридизация на микрочипах.

MDA (multiple displacement amplification) - амплификация с множественным вытеснением цепи.

NGS (Next generation sequencing) высокопроизводительное секвенирование.

SNP-гаплотипирование - (single-nucleotide polymorphism) гаплотипирование с помощью однонуклеотидных полиморфизмов.

STR-анализ - (short tandem repeat) – фрагментный анализ коротких tandemных повторов.

WGA-PCR (whole genome amplification) – полногеномная амплификация, основанная на ПЦР.

## ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Мультиплексная ПЦР — вариант ПЦР (см.), который подразумевает одновременную амплификацию нескольких ДНК-мишеней с использованием более одной пары праймеров в одной реакционной пробирке.

Полимеразная цепная реакция — метод ферментативной наработки *in vitro* определенных, сравнительно коротких (от нескольких десятков до нескольких тысяч пар нуклеотидов) двуцепочечных фрагментов ДНК. При проведении ПЦР используют, как правило, два праймера, взаимодействующих в соответствии с принципом комплементарности с противоположными цепями ДНК и ограничивающих участок матричной молекулы, который и будет амплифицирован в ходе реакции. Традиционная ПЦР состоит из повторяющихся температурных циклов. Каждый цикл делится на три различных температурных режима: разрушение водородных связей между цепями ДНК (93-96 °С), гибридизация праймеров на ДНК (40-75 °С) и синтез комплементарных цепей ДНК путем удлинения праймеров (60-75 °С). В результате повторения циклов ПЦР увеличение количества, ограниченного праймерами фрагмента ДНК, идет в геометрической прогрессии.

Хромосомный микроматричный анализ — способ полногеномного анализа, основанный на определении наличия в анализируемом образце большого количества малых фрагментов — «проб». Используя данные о последовательности генома, отбирается большое количество — сотни тысяч — проб, распределённых по геному либо равномерно, либо с учётом выявляемых патологий. Данные пробы наносятся на «матрицу» — как правило, стеклянную или из аналогичного инертного материала — на которую затем наносят препарат анализируемого генетического материала и определяют относительное содержание всех проб. В клинической практике используют типовые наборы проб, матрицы с которыми изготавливаются заводским способом.

Высокопроизводительное секвенирование — метод определения нуклеотидной последовательности, основанный на массовом параллельном секвенировании специальным образом подготовленных одностратных библиотек фрагментированной ДНК исследуемых образцов. Большинство технологий высокопроизводительного секвенирования включают в себя следующие этапы: подготовку библиотек, непосредственно секвенирование и анализ полученных данных. Подготовка библиотек включает в себя фрагментирование ДНК до 300-500 нуклеотидных пар, лигирование (присоединение) секвенсовых адаптеров (синтезированные олигонуклеотиды с известной последовательностью) с концами фрагментов и амплификацию полученных библиотек. Метод амплификации может отличаться для различных платформ. Например, платформа Ion torrent от Thermo Fisher Scientific использует метод эмульсионной ПЦР для амплификации одноцепочечных фрагментов на микросферах, в то время как технология фирмы Illumina основана на амплификации фрагментов методом мостиковой ПЦР и формировании кластеров на проточной ячейке. Секвенирование производится путем синтеза новых фрагментов ДНК на одноцепочечных ДНК-библиотеках, которые выполняют роль матрицы. Нуклеотиды встраиваются в новую цепь в определенном порядке, соответствующем матричной цепи, который записывается в цифровом виде. После включения в цепь каждого последующего нуклеотида прибор регистрирует сигнал. Разные платформы для NGS используют различные механизмы детекции встроенных в новую цепь нуклеотидов: детекцию флуоресцентного сигнала после включения в цепь комплементарного матрице нуклеотида (Illumina, SOLiD Applied Biosystems), изменение pH раствора в микрореакторе, связанное с выделением в среду ионов водорода в ходе синтеза ДНК ферментом (Ion torrent Thermo Fisher Scientific), или регистрацию светового сигнала после выделения пирофосфата, активирующего каскад химических реакций.

После секвенирования полученные данные проходят несколько этапов биоинформатической обработки: исключение ридов с низким качеством

прочтения, выравнивание данных относительно референсной последовательности или сборку последовательности *de novo* и анализ результатов секвенирования.

Полногеномное секвенирование — секвенирование всего генома организма. Подразумевается, что используется метод высокопроизводительного секвенирования, так как любые другие подходы на практике не применимы по причине чрезвычайной дороговизны, трудоёмкости и длительности.

Полноэкзомное секвенирование — выборочное секвенирование последовательностей всех экзонов (транскрибируемых фрагментов генов) всех генов организма. Используется метод высокопроизводительного секвенирования. Отделение фрагментов экзонов от некодирующих последовательностей выполняется путём обогащения исходного препарата экзонными последовательностями методом гибридизации с набором зондов, модифицированных для простой селекции (например, иммобилизованных на малых гранулах, что позволяет отделить их вместе с целевыми фрагментами простым центрифугированием). Полученные «сырые» данные секвенирования анализируют, сравнивая с референсной аннотированной последовательностью генома.

Полногеномная амплификация - метод ферментативной наработки *in vitro* определенных двуцепочечных фрагментов ДНК, относящихся ко всем хромосомам исследуемой клетки. В зависимости от конкретно применяемой методики полногеномной амплификации наработанные фрагменты могут иметь различный размер, плотность расположения на соответствующей хромосоме и другие характеристики.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бейк Е.П., Эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста. / Бейк Е.П., Коротченко О.Е., Гвоздева А.Д., Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В. // Гинекология. 2018. № 1 (20). С. 109–112.

2. Бейк Е.П., Роль преимплантационного генетического скрининга в повышении эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста. / Бейк Е.П., Коротченко О.Е., Гвоздева А.Д., Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В. // Акушерство и гинекология. 2018. № 4. С. 78–84.

3. Беляева Н.А., Возможности применения преимплантационной генетической диагностики с целью повышения эффективности программ ЭКО/ИКСИ у супружеских пар с мужским фактором бесплодия и генетическими особенностями у мужчин. / Беляева Н.А., Калинина Е.А., Горшинова В.К., Зобова А.В., Глинкина Ж.И. // Акушерство и гинекология. 2016. № 8. С. 107–111.

4. Гудков Г.В., Возможность определения однонуклеотидных полиморфизмов и HLA-генотипирования эмбрионов на основании генетического материала бластомеров в программах преимплантационного скрининга. / Гудков Г.В., Филиппов Е.Ф., Тен Ф.П., и др. // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2017. № 134. С. 99–114.

5. Жигалина Д.И., Сравнительная цитогенетика эмбриобласта, трофэктодермы и внутриполостной жидкости бластоцисты человека. / Жигалина Д.И., Скрыбин Н.А., Канбекова О.Р., Артюхова В.Г., Светлаков А.В., Лебедев И.Н. // Медицинская генетика. 2018. № 2 (17). С. 46–52.

6. Жигалина Д.И., Структура хромосомных аномалий в циклах ЭКО-ПГС. /

Жигалина Д.И., Скрыбин Н.А., Канбекова О.Р., Марошкина А.Н., Чуркин Е.О., Лебедев И.Н. // Медицинская генетика. 2019. № 3(201) (18). С. 47–54.

7. Жикривецкая С.О., Преимплантационная генетическая диагностика дупликации в районе 17p11.2 / Жикривецкая С.О., Орлова А.А., Мусатова Е.В., Софронова Я.В., Померанцева Е.А. // Медицинская генетика. 2017. № 11 (16). С. 11–16.

8. Квашнина Е.В., Преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии в различных типах протоколов вспомогательных репродуктивных технологий с витрифицированным эмбрионом. / Квашнина Е.В., Тутаков М.А., Вахлова О.С., Томина Е.В., Шилова Н.В. // Акушерство и Гинекология. 2021. (3\_2021). С. 175–182.

9. Коган И.Ю., Преимплантационное генетическое тестирование моногенных заболеваний. / Коган И.Ю., Яковлев П.П., Гзгзян А.М., и др. // Журнал акушерства и женских болезней. 2018. № 1 (67). С. 92–95.

10. Лебедева О.Е., Результаты предимплантационной диагностики FISH-методом супружеских пар с нормальным кариотипом. / Лебедева О.Е., Глинкина Ж.И., Иконников М.В., Романова Н.В. // Акушерство и гинекология. 2010. (4). С. 64–66.

11. Малышева О.В., Технологические платформы преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии: сравнительная эффективность диагностики хромосомной патологии. / Малышева О.В., Бичева Н.К., Гзгзян А.М., и др. // Акушерство и гинекология. 2020. № 4. С. 65–71.

12. Сесина Н.И., Детекция ДНК в аспирате полости бластоцисты человека методом мультиплексной ПЦР. / Сесина Н.И., Воскобоева Е.Ю., Краснопольская К.В. // Онтогенез. 2018. № 5 (49). С. 324–330.

13. Смирнова А.А., Невынашивание беременности как показание к преимплантационному генетическому тестированию. / Смирнова А.А.,

Зыряева Н.А., Жорданидзе Д.О., Аншина М.Б., Кира Е.Ф. // Репродуктивная медицина. 2019. № 3(40). С. 65–71.

14. Смирнова А.А., Преимплантационное генетическое тестирование с целью профилактики невынашивания беременности после ЭКО. / Смирнова А.А., Зыряева Н.А., Жорданидзе Д.О., и др. // Журнал акушерства и женских болезней. 2019. № 5 (68). С. 75–82.

15. Соловьева Е.В., Валидация систем преимплантационного тестирования моногенных заболеваний на единичных клетках и продуктах полногеномной амплификации. / Соловьева Е.В., Канбекова О.Р., Жигалина Д.И., Скрыбин Н.А., Минайчева Л.И. // Медицинская генетика. 2020. № 11(220) (19). С. 63–64.

16. Фетисова И.Н., Результаты преимплантационного генетического тестирования эмбрионов у пациенток позднего репродуктивного возраста. / Фетисова И.Н., Малышкина А.И., Бойко ЕЛ, и др. // Вестник Ивановской медицинской академии. 2019. № 2 (24). С. 36–38.

17. Фирсова Н.В., Эффективность проведения преимплантационного генетического тестирования в программах экстракорпорального оплодотворения: опыт сети клиник. / Фирсова Н.В., Нигматова Н.П., Сафронова К.А., и др. // Проблемы репродукции. 2021. (27). С. 115–124.

18. Adler A, Blastocyst culture selects for euploid embryos: Comparison of blastomere and trophoctoderm biopsies. / Adler A, Lee H.L, McCulloh D.H, и др. // Reproductive BioMedicine Online. 2014. № 4 (28). С. 485–491.

19. Alfarawati S, The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. / Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, и др. // Fertility and Sterility. 2011. № 2 (95). С. 520–524.

20. Backenroth D, Haploseek: a 24-hour all-in-one method for preimplantation genetic diagnosis (PGD) of monogenic disease and aneuploidy. / Backenroth D, Zahdeh F, Kling Y, и др. // Genetics in Medicine. 2019. № 6 (21). С. 1390–1399.

21. Boucret L, Relationship between diminished ovarian reserve and mitochondrial biogenesis in cumulus cells. / Boucret L, Chao De La Barca J.M, Morinière C, и др. // Human Reproduction. 2015. № 7 (30). С. 1653–1664.

22. Capalbo A, Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: Insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. / Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, и др. // Human Reproduction. 2013. № 2 (28). С. 509–518.

23. Capalbo A, Mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. / Capalbo A, Rienzi L. // Fertility and Sterility. 2017. № 5 (107). С. 1098–1106.

24. Christopikou D, Polar body analysis by array comparative genomic hybridization accurately predicts aneuploidies of maternal meiotic origin in cleavage stage embryos of women of advanced maternal age. / Christopikou D, Tsorva E, Economou K, и др. // Human Reproduction. 2013. № 5 (28). С. 1426–1434.

25. Coll L, Transition from blastomere to trophectoderm biopsy: Comparing two preimplantation genetic testing for aneuploidies strategies. / Coll L, Parriego M, Boada M, и др. // Zygote. 2018. № 3 (26). С. 191–198.

26. Coonen E, ESHRE PGT Consortium data collection XVI–XVIII: cycles from 2013 to 2015†. / Coonen E, van Montfoort A, Carvalho F, и др. // Human Reproduction Open. 2020. № 4 (2020).

27. Dumesic D.A, Cumulus cell mitochondrial resistance to stress in vitro predicts oocyte development during assisted reproduction. / Dumesic D.A, Guedikian A.A, Madrigal V.K, и др. // The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2016. № 5 (101). С. 2235–2245.

28. Deleye L, Whole genome amplification with SurePlex results in better copy number alteration detection using sequencing data compared to the MALBAC method. / Deleye L, De Coninck D, Christodoulou C, и др. // Scientific Reports. 2015. № January (5). С. 11711.

29. Diez-Juan A, Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: less is better. / Diez-Juan A, Rubio C, Marin C, и др. // *Fertility and sterility*. 2015. № 3 (104).

30. Simsek-Duran F, Age-Associated Metabolic and Morphologic Changes in Mitochondria of Individual Mouse and Hamster Oocytes. / Simsek-Duran F, Li F, Ford W, Swanson R.J, Jones H.W, Castora F.J. // *PloS one*. 2013. № 5 (8).

31. Fiorentino F, PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. / Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, и др. // *Human reproduction (Oxford, England)*. 2011. № 7 (26). С. 1925–35.

32. Fiorentino F, Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. / Fiorentino F, Biricik A, Bono S, и др. // *Fertility and Sterility*. 2014. № 5 (101).

33. Fiorentino F, Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. / Fiorentino F, Bono S, Biricik A, и др. // *Human Reproduction*. 2014. № 12 (29). С. 2802–2813.

34. Fishel S, Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy-the future of IVF? / Fishel S, Gordon A, Lynch C, и др. // *Fertility and sterility*. 2010. № 3 (93). С. 1006.e7-1006.e10.

35. Forman E.J, Comprehensive chromosome screening and embryo selection: Moving toward single euploid blastocyst transfer. / Forman E.J, Hong K.H, Treff N.R, Scott R.T. // *Seminars in Reproductive Medicine*. 2012. № 3 (30). С. 236–242.

36. Fragouli E, Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. / Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft W.B, Wells D. // *Human Reproduction*. 2008. № 11 (23). С. 2596–2608.

37. Fragouli E, Comprehensive chromosome screening of polar bodies and

blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. / Fragouli E, Katz-Jaffe M, Alfarawati S, и др. // *Fertility and Sterility*. 2010. № 3 (94). С. 875–887.

38. Fragouli E, Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: Scientific data and technical evaluation. / Fragouli E, Alfarawati S, Daphnis D.D, и др. // *Human Reproduction*. 2011. № 2 (26). С. 480–490.

39. Fragouli E, The origin and impact of embryonic aneuploidy. / Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, и др. // *Human Genetics*. 2013. № 9 (132). С. 1001–1013.

40. Fragouli E, Altered Levels of Mitochondrial DNA Are Associated with Female Age, Aneuploidy, and Provide an Independent Measure of Embryonic Implantation Potential. / Fragouli E, Spath K, Alfarawati S, и др. // *PLoS Genetics*. 2015. № 6 (11). С. e1005241.

41. Fragouli E, Clinical implications of mitochondrial DNA quantification on pregnancy outcomes: A blinded prospective non-selection study. / Fragouli E, McCaffrey C, Ravichandran K, и др. // *Human Reproduction*. 2017. № 11 (32). С. 2340–2347.

42. Fragouli E, Mitochondrial DNA Assessment to Determine Oocyte and Embryo Viability. / Fragouli E, Wells D. // *Seminars in Reproductive Medicine*. 2015. Т. 33. № 6. С. 401–409.

43. Frahm T, Lack of age-related increase of mitochondrial DNA amount in brain, skeletal muscle and human heart. / Frahm T, Mohamed S.A, Bruse P, Gemünd C, Oehmichen M, Meissner C. // *Mechanisms of Ageing and Development*. 2005. № 11 (126). С. 1192–1200.

44. Gao J, Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion. / Gao J, Liu C, Yao F, и др. // *Molecular Cytogenetics*. 2012. № 1 (5).

45. Geraedts J, Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. / Geraedts J, Montag M, Magli M.C, и др. // Human Reproduction. 2011. № 11 (26). С. 3173–3180.

46. Gutiérrez-Mateo C, Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. / Gutiérrez-Mateo C, Colls P, Sánchez-García J, и др. // Fertility and Sterility. 2011. № 3 (95). С. 953–958.

47. Handyside A.H, Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by dna amplification. / Handyside A.H, Penketh R.J.A, Winston R.M.L, Pattinson J.K, Delhanty J.D.A, Tuddenham E.G.D. // The Lancet. 1989. № 8634 (333). С. 347–349.

48. Handyside A.H, Karyomapping: A universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. / Handyside A.H, Harton G, Mariani B, и др. // Journal of Medical Genetics. 2010. № 10 (47). С. 651–658.

49. Handyside A. H. 24-chromosome copy number analysis: A comparison of available technologies // Fertility and Sterility. 2013. Т. 100. № 3. С. 595–602.

50. Hardarson T, Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: A randomized controlled trial. / Hardarson T, Hanson C, Lundin K, и др. // Human Reproduction. 2008. № 12 (23). С. 2806–2812.

51. Harton G, Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. / Harton G, Munné S, Surrey M, и др. // Fertility and Sterility. 2013. № 6 (100). С. 1695–1703.

52. Hellani A, Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. / Hellani A, Abu-Amero K, Azouri J, El-Akoum S. // Reproductive BioMedicine Online. 2008. № 6 (17). С. 841–

847.

53. Hodes-Wertz B, Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. / Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S, и др. // *Fertility and Sterility*. 2012. № 3 (98). С. 675–680.

54. Idowu D, Pregnancy outcomes following 24-chromosome preimplantation genetic diagnosis in couples with balanced reciprocal or Robertsonian translocations. / Idowu D, Merrion K, Wemmer N, и др. // *Fertility and Sterility*. 2015. Т. 103. № 4. С. 1037–1042.

55. Kaarouch I, Impact of sperm genome decay on Day-3 embryo chromosomal abnormalities from advanced-maternal-age patients. / Kaarouch I, Bouamoud N, Louanjli N, и др. // *Molecular Reproduction and Development*. 2015. № 10 (82). С. 809–819.

56. Kallioniemi A, Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. / Kallioniemi A, Kallioniemi O.P, Sudar D, и др. // *Science*. 1992. № 5083 (258). С. 818–821.

57. Kazachkova N, Mitochondrial DNA damage patterns and aging: Revising the evidences for humans and mice. / Kazachkova N, Ramos A, Santos C, Lima M. // *Aging and Disease*. 2013. № 6 (4). С. 337–350.

58. Kung A, Validation of next-generation sequencing for comprehensive chromosome screening of embryos. / Kung A, Munné S, Bankowski B, Coates A, Wells D. // *Reproductive BioMedicine Online*. 2015. № 6 (31). С. 760–769.

59. Kuwayama M, Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. / Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. // *Reproductive BioMedicine Online*. 2005. № 3 (11). С. 300–308.

60. Lamb NE, Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21. / Lamb N.E, Yu K, Shaffer J, Feingold E, Sherman SL. // *American Journal*

of Human Genetics. 2005. № 1 (76). С. 91–99.

61. Li N, The Performance of Whole Genome Amplification Methods and Next-Generation Sequencing for Pre-Implantation Genetic Diagnosis of Chromosomal Abnormalities. / Li N, Wang L, Wang H, и др. // Journal of Genetics and Genomics. 2015. № 4 (42). С. 151–159.

62. de los Santos MJ, Variables associated with mitochondrial copy number in human blastocysts: what can we learn from trophectoderm biopsies? Fertility and Sterility. / de los Santos M.J, Diez Juan A, Mifsud A, и др. // Fertility and Sterility. 2018. № 1 (109). С. 110–117.

63. Ogino M, Mitochondrial DNA copy number in cumulus cells is a strong predictor of obtaining good-quality embryos after IVF. / Ogino M, Tsubamoto H, Sakata K, и др. // Journal of assisted reproduction and genetics. 2016. № 3 (33). С. 367–371.

64. Magli M.C, Preimplantation genetic testing: Polar bodies, blastomeres, trophectoderm cells, or blastocoelic fluid? Fertility and Sterility. / Magli M.C, Pomante A, Cafueri G, и др. // Fertility and Sterility. 2016. № 3 (105). С. 676-683.e5.

65. Masset H, Multi-centre evaluation of a comprehensive preimplantation genetic test through haplotyping-by-sequencing. / Masset H, Zamani Esteki M, Dimitriadou E, и др. // Human Reproduction. 2019. № 8 (34). С. 1608–1619.

66. Mastenbroek S, Embryo selection in IVF. / Mastenbroek S, van der Veen F, Aflatoonian A, Shapiro B, Bossuyt P, Repping S. // Human Reproduction. 2011. № 5 (26). С. 964–966.

67. McArthur S.J, Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. / McArthur S.J, Leigh D, Marshall J.T, de Boer K.A, Jansen R.P.S. // Fertility and Sterility. 2005. № 6 (84). С. 1628–1636.

68. Mohamed S.A, Mitochondrial DNA deletions and the aging heart. / Mohamed S.A, Hanke T, Erasmi A.W, и др. // *Experimental Gerontology*. 2006. № 5 (41). С. 508–517.

69. Munné S, Fertilization and early embryology: Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. / Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. // *Human Reproduction*. 1993. № 12 (8). С. 2185–2191.

70. Munné S, Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: A multiple-probe FISH study. / Munné S, Grifo J, Cohen J, Weier H.U.G. // *American Journal of Human Genetics*. 1994. № 1 (55). С. 150–159.

71. Munné S, Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. / Munné S, Chen S, Collis P, и др. // *Reproductive BioMedicine Online*. 2007. № 5 (14). С. 628–634.

72. Munné S, Reprint of: Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. / Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. // *Fertility and Sterility*. 2019. № 4 (112). С. e71–e80.

73. Munné S, Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing. / Munné S, Wells D. // *Fertility and Sterility*. 2017. T. 107. № 5. С. 1085–1091.

74. Munné S, Technology requirements for preimplantation genetic diagnosis to improve assisted reproduction outcomes. / Munné S, Wells D, Cohen J. // *Fertility and Sterility*. 2010. № 2 (94). С. 408–430.

75. Novik V, The accuracy of chromosomal microarray testing for identification of embryonic mosaicism in human blastocysts. / Novik V, Moulton E.B, Sisson M.E, и др. // *Molecular Cytogenetics*. 2014. № 1 (7).

76. Popovic M, Chromosomal mosaicism in human blastocysts: the ultimate challenge of preimplantation genetic testing? *Hum Reprod*. / Popovic M, Dheedene A,

Christodoulou C, и др. // Human reproduction (Oxford, England). 2018. № 7 (33). С. 1342–1354.

77. Ravichandran K, Mitochondrial DNA quantification as a tool for embryo viability assessment: Retrospective analysis of data from single euploid blastocyst transfers. / Ravichandran K, McCaffrey C, Grifo J, и др. // Human Reproduction. 2017. № 6 (32). С. 1282–1292.

78. Del Rey J, Novel double factor PGT strategy analyzing blastocyst stage embryos in a single NGS procedure. / Del Rey J, Vidal F, Ramírez L, и др. // PLoS ONE. 2018. № 10 (13).

79. Rubio C, Use of array comparative genomic hybridization (array-CGH) for embryo assessment: Clinical results. / Rubio C, Rodrigo L, Mir P, и др. // Fertility and Sterility. Vol 99. ; 2013:1044-1048. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.01.094

80. Sahoo T, Comprehensive genetic analysis of pregnancy loss by chromosomal microarrays: outcomes, benefits, and challenges. / Sahoo T, Dzidic N, Strecker M.N, и др. // Genetics in Medicine. 2017. № 1 (19). С. 83–89.

81. Salvaggio C.N, Polar body based aneuploidy screening is poorly predictive of embryo ploidy and reproductive potential. / Salvaggio C.N, Forman E.J, Garnsey H.M, Treff N.R, Scott R.T. // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2014. № 9 (31). С. 1221–1226.

82. Schoolcraft W.B, Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. / Schoolcraft W.B, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe M.G, Wells D. // Fertility and Sterility. 2010. № 5 (94). С. 1700–1706.

83. Scott R.T, Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: A randomized and paired clinical trial. / Scott R.T, Upham K.M, Forman E.J, Zhao T, Treff N.R. // Fertility and Sterility. 2013. № 3 (100). С. 624–630.

84. Sermon K.D, Detecting mosaicism in trophectoderm biopsies. / Sermon K.D, Spits C, Mertzaniidou A, Vermeesch J.R, Fiorentino F. // Human Reproduction. 2017. T. 32. № 3. C. 712–713.

85. Short K.R, Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. / Short K.R, Bigelow M.L, Kahl J, и др. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005. № 15 (102). C. 5618–5623.

86. Sills ES, Determining parental origin of embryo aneuploidy: Analysis of genetic error observed in 305 embryos derived from anonymous donor oocyte IVF cycles. / Sills E.S, Li X, Frederick J.L, Khoury C.D, Potter D.A. // Molecular Cytogenetics. 2014. № 1 (7).

87. Stigliani S, Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome. / Stigliani S, Persico L, Lagazio C, Anserini P, Venturini PL, Scaruffi P. // Molecular Human Reproduction. 2014. № 12 (20). C. 1238–1246.

88. Takeuchi K. Pre-implantation genetic testing: Past, present, future // Reproductive Medicine and Biology. 2021. № 1 (20). C. 27–40.

89. Tan Y, Clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis and screening using next generation sequencing. / Tan Y, Yin X, Zhang S, и др. // GigaScience. 2014. № 1 (3).

90. Treff N.R, Accurate single cell 24 chromosome aneuploidy screening using whole genome amplification and single nucleotide polymorphism microarrays. / Treff N.R, Su J, Tao X, Levy B, Scott R.T. // Fertility and Sterility. 2010. № 6 (94). C. 2017–2021.

91. Treff N.R, Single-cell whole-genome amplification technique impacts the accuracy of SNP microarray-based genotyping and copy number analyses. / Treff N.R, Su J, Tao X, Northrop L.E, Scott R.T. // Molecular Human Reproduction. 2011. № 6 (17). C. 335–343.

92. Treff N.R, Methods for comprehensive chromosome screening of oocytes and embryos: Capabilities, limitations, and evidence of validity. / Treff N.R, Scott R.T. // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2012. № 5 (29). С. 381–390.

93. Turner K, Multicolor detection of every chromosome as a means of detecting mosaicism and nuclear organization in human embryonic nuclei. / Turner K, Fowler K, Fonseka G, Griffin D, Ioannou D. // Panminerva Medica. 2016. № 2 (58). С. 175–190.

94. Vanneste E, Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. / Vanneste E, Voet T, le Caignec C, и др. // Nature Medicine. 2009. № 5 (15). С. 577–583.

95. Verlinsky Y, Analysis of the first polar body: Preconception genetic diagnosis. / Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom C.M. // Human Reproduction. 1990. № 7 (5). С. 826–829.

96. Verlinsky Y, Diagnosing and preventing inherited disease: Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. / Verlinsky Y, Cieslak J, Freidine M, и др. // Human Reproduction. 1995. № 7 (10). С. 1923–1927.

97. Verpoest W, Preimplantation genetic testing for aneuploidy by microarray analysis of polar bodies in advanced maternal age: A randomized clinical trial. / Verpoest W, Staessen C, Bossuyt P.M, и др. // Human Reproduction. 2018. № 9 (33). С. 1767–1776.

98. Victor A.R, Accurate quantitation of mitochondrial DNA reveals uniform levels in human blastocysts irrespective of ploidy, age, or implantation potential. / Victor A.R, Brake A.J, Tyndall J.C, и др. // Fertility and sterility. 2017. № 1 (107).

99. Viotti M. Preimplantation genetic testing for chromosomal abnormalities: Aneuploidy, mosaicism, and structural rearrangements // Genes. 2020. № 6 (11).

100. Voullaire L, Chromosome abnormalities identified by comparative genomic

hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. / Voullaire L, Wilton L, McBain J, Callaghan T, Williamson R. // *Molecular Human Reproduction*. 2002. № 11 (8). С. 1035–1041.

101. Wang L, Detection of chromosomal aneuploidy in human preimplantation embryos by next-generation sequencing. / Wang L, Wang X, Zhang J, и др. // *Biology of Reproduction*. 2014. № 5 (90). С. 95–96.

102. Wells D. Mitochondrial DNA quantity as a biomarker for blastocyst implantation potential // *Fertility and Sterility*. 2017. Т. 108. № 5. С. 742–747.

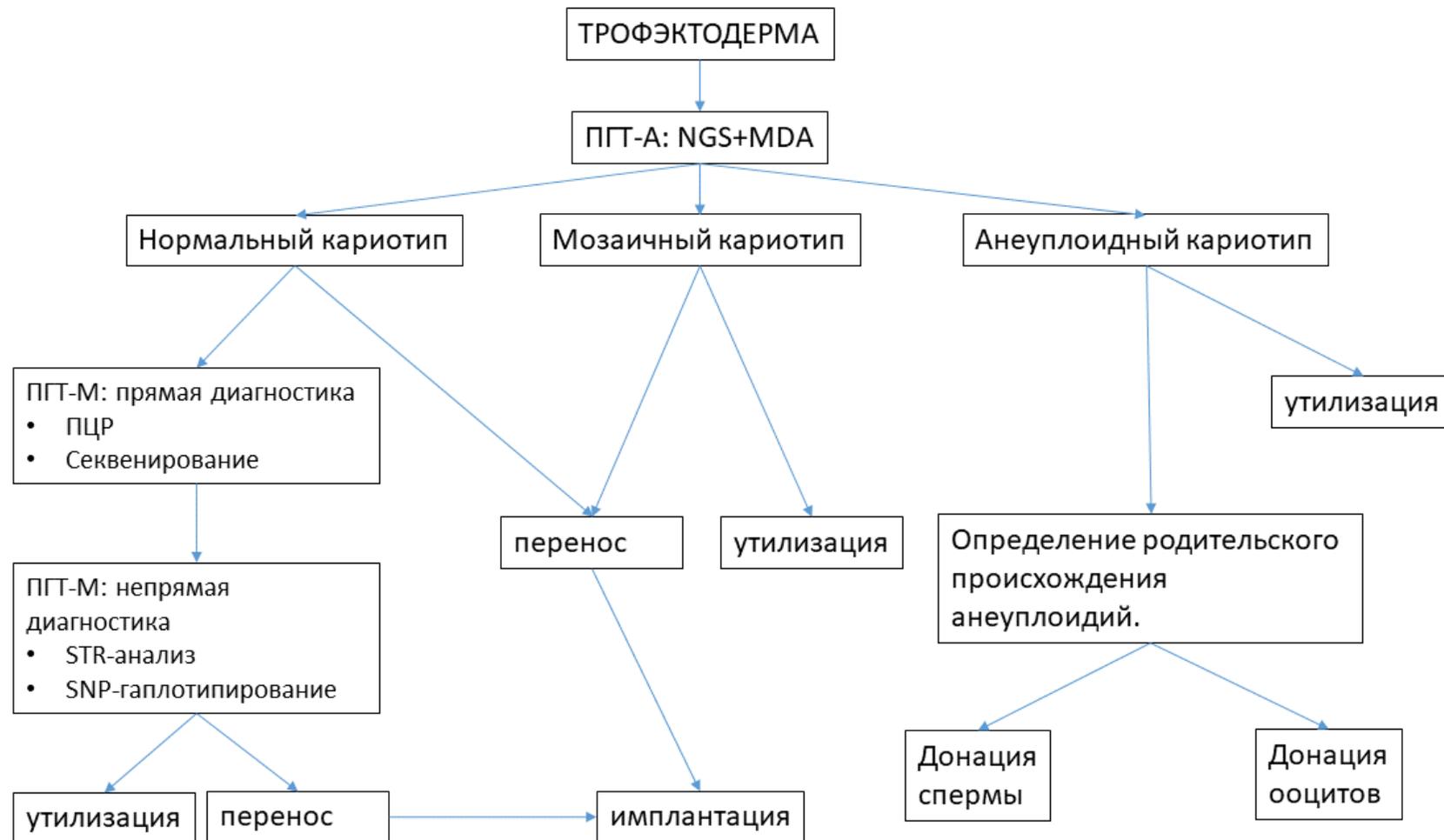
103. Xiong B, Using SNP array to identify aneuploidy and segmental imbalance in translocation carriers. / Xiong B, Tan K, Tan Y.Q, и др. // *Genomics Data*. 2014. (2). С. 92–95.

104. Yang Z, Selection of euploid blastocysts for cryopreservation with array comparative genomic hybridization (aCGH) results in increased implantation rates in subsequent frozen and thawed embryo transfer cycles. / Yang Z, Salem S.A, Liu X, Kuang Y, Salem R.D, Liu J. // *Molecular Cytogenetics*. 2013. № 1 (6).

105. Yang Z, Randomized comparison of next-generation sequencing and array comparative genomic hybridization for preimplantation genetic screening: A pilot study. / Yang Z, Lin J, Zhang J, и др. // *BMC Medical Genomics*. 2015. № 1 (8). С. 1–13.

106. Yin XY, Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophoctoderm cells of human blastocysts. / Yin X.Y, Tan K, Vajta G, и др. // *Biology of Reproduction*. 2013. № 3 (88).

107. Zamani Esteki M, Concurrent Whole-Genome Haplotyping and Copy-Number Profiling of Single Cells. / Zamani Esteki M, Dimitriadou E, Mateiu L, и др. // *American Journal of Human Genetics*. 2015. № 6 (96). С. 894–912.

**Приложение 1. Предлагаемая схема обследования эмбрионов.**

## Приложение 2. Пример выдачи заключения на ПГТ-А.



ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
117513, Москва, ул. Академика Опарина, дом 4, тел. (495) 438-2292



### Лаборатория молекулярно-генетических методов

Пациент:

Пол: женский

Дата рождения:

Договор от:

Направлен:

Врач:

№ ИБ (АК):

Примечание:



### Предимплантационное генетическое тестирование (ПГТ)

Исследованные эмбрионы	Результат	Примечание
Количество эмбрионов	7	
Эмбрион 1 Али2	seq(15q22.2q26.3)x1	
Эмбрион 2 Али4	seq(1-22,X)x2	
Эмбрион 3 Али5	seq(7)x1.65, (10)x2.45, (11q11q25)x2.65, (15q11.2q26.3)x2.4	
Эмбрион 4 Али9	seq(1-22,X)x2	
Эмбрион 5 Али20	seq(1-22,X)x2	
Эмбрион 6 Али22	seq(9q21.11q34.3)x3	
Эмбрион 7 Али25	seq(1-22)x2, (X,Y)x1	
Заключение	Для переноса рекомендованы эмбрионы Али4, Али9, Али20 и Али25.	

Исследование выполнил:



### Соответствующий биоматериал

№	Биоматериал	Идентификатор контейнера	Материал получен
6106	Трофэктодерма		

Пациент:

Договор:

Страница 1

## Приложение 3. Пример выдачи заключения на ПГТ-М

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании направления врача-генетика \_\_\_\_. в семье \_\_\_\_ проводилось преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ-А и ПГТ-М) в связи с наличием в цитруллинемии тип 1, ассоциированной с мутацией p.G390R в гене ASS1. Вариант был обнаружен ранее в ФГБУ «МГНЦ» у жены в гетерозиготном состоянии, у мужа в гетерозиготном состоянии, у погибшего ребенка \_\_\_\_ в гомозиготном состоянии. Тип наследования аутосомно-рецессивный.

Для исследования был представлен следующий биологический материал:

1. \_\_\_\_ – периферическая кровь;
2. \_\_\_\_ – материал трофэктодермы;

На первом этапе исследования эмбрионов на полученном материале трофэктодермы проводилось преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ПГТ-А) методом NGS. Сбалансированный молекулярный кариотип был выявлен в эмбрионах \_\_\_\_\_. В остальных эмбрионах были выявлены хромосомные нарушения и дальнейший анализ для них не проводился.

На втором этапе исследования проводилась прямая ДНК-диагностика эмбрионов методом секвенирования по Сэнгеру. Мутация p.G390R в гене ASS1 была выявлена в гомозиготном состоянии в эмбрионах **7МТВ** и **9МТВ**; в гетерозиготном состоянии в эмбрионе **3МТВ**. Мутация не была выявлена у эмбриона **4МТВ**.

На третьем этапе исследования проводили косвенную ДНК-диагностику эмбрионов **3МТВ**, **4МТВ**, **7МТВ** и **9МТВ** с помощью STR-анализа. Согласно результатам косвенной ДНК-диагностики эмбрионы **7МТВ** и **9МТВ** унаследовали от матери и отца фрагменты хромосомы 9, несущие мутацию p.G390R в гене ASS1. Эмбрион **3МТВ** унаследовал от матери фрагмент хромосомы 9, несущий мутацию p.G390R в гене ASS1, а от отца фрагмент хромосомы 9 без мутации. Эмбрион **4МТВ** унаследовал от матери и отца фрагменты хромосомы 9 без мутации. Таким образом результаты косвенной диагностики подтверждают результаты прямой.

Эмбрион	Молекулярный кариотип	Сиквенс по сэнгеру	STR-анализ	Рекомендация к переносу
<b>3МТВ</b>	seq(1-22,X)x2	<b>N/mut</b>	<b>N/mut</b>	<b>Рекомендован</b>
<b>4МТВ</b>	seq(1-22)x2, (X,Y)x1	<b>N/N</b>	<b>N/N</b>	<b>Рекомендован</b>
<b>7МТВ</b>	seq(1-22)x2, (X,Y)x1	mut/mut	mut/mut	Не рекомендован
<b>9МТВ</b>	seq(1-22)x2, (X,Y)x1	mut/mut	mut/mut	Не рекомендован

Заключение:

1) В результате проведенного преимплантационного генетического тестирования не выявлено противопоказаний к переносу в полость матки в рамках программы ЭКО эмбрионов **3МТВ** и **4МТВ**;

2) Рекомендовано очное медико-генетическое консультирование для разъяснения результатов обследования;

3) Рекомендуется проведение пренатальной инвазивной диагностики для подтверждения результата преимплантационного генетического тестирования.

Врач-лабораторный генетик

Врач-генетик

Дата: