

На правах рукописи

ЕКИМОВ АЛЕКСЕЙ НИКОЛАЕВИЧ

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

1.5.7. Генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:
доктор медицинских наук

Каретникова Наталия Александровна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук,
профессор

Черных Вячеслав Борисович

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», лаборатория генетики нарушений репродукции, заведующий лабораторией.

Доктор медицинских наук,
профессор

Фетисова Ирина Николаевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, ФГБОУ ВО ИВГМА МЗ РФ, кафедра акушерства и гинекологии, медицинской генетики, профессор.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации ФГБНУ НИИ АГиР им. Д.О. Отта, г. Санкт-Петербург.

Защита диссертации состоится «20» сентября 2022 г. в ___ часов на заседании Диссертационного совета 21.2.058.09 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1 и на сайте www.rsmu.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор



Ларина Вера Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 трофобласта. 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

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 aCGH (Agilent, США).

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

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 бластоциты и клетках кумулюса, фрагментацией ДНК сперматозоидов с частотой аномальных кариотипов эмбрионов, следует учитывать в схемах подготовки к ВРТ.

Положения, выносимые на защиту.

1. Трофэктодерма бластоцисты 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 АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России и применяются в практической работе Института репродуктивной генетики, Института репродуктивной медицины, а также Российско-немецкого центра репродукции и клинической эмбриологии «Поколение NEXT».

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 АГП 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. Указатель литературы содержит 107 библиографических источников, в том числе 17 отечественных публикаций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С помощью молекулярно-генетических методов обследовано:

3691 эмбрион;

448 супружеских пар;

454 ооцит-кумулюсных комплекса.

Сравнение результатов ПГС, 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 WGA-PCR (Rubicon, США) и MDA (Qiagen, США). 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.

Изучение особенностей мозаицизма эмбрионов

Использовали материал биопсии 17 образцов трофэктодермы эмбрионов.

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

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

Определение копийности митохондриальной ДНК в кумулюсе

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 WGA-PCR (Rubicon, США) согласно инструкции производителя.

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

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 WGA-PCR (Rubicon, США) и MDA (Qiagen, 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 MT-ND2) были специально разработаны в рамках данного исследования. Нормировку полученных результатов проводили на геномную ДНК (ген LTC4S).

Сравнение уровня анеуплоидий эмбрионов у мужчин с различной долей морфологически нормальных сперматозоидов.

В исследование были включены 147 пар.

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

Сравнение уровня анеуплоидий эмбрионов у супружеских пар с фрагментацией ДНК сперматозоидов

В исследование были включены 170 пар.

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

Генотипирование эмбрионов с помощью STR-анализа

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

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

SNP-гаплотипирование

В рамках данной работы было обследовано 23 семьи с моногенной патологией

Полногеномную амплификацию проводили с помощью WGA-PCR (Rubicon, США) и MDA (Qiagen, США).

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

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.

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.

Статистика.

Количественные данные после определения вида распределения (нормальное или ненормальное) были представлены в виде средних значений со стандартным отклонением (Mean+/-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.

Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$ (95% уровень значимости), при $p < 0,01$ (99% уровень значимости). Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы MS Excel и программы SPSS Statistics 17.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Трофэктодерма –основной материал для проведения преимплантационных генетических технологий

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.

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.

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

В настоящей работе не применяли FISH – метод из-за ограниченного числа анализируемых хромосом. При исследовании методами aCGH и NGS трофэктодермы 38 эмбрионов получены результаты, представленные в таблице 1.

Таблица 1 Результаты ПГТ-А трофэктодермы aCGH и NGS методами

Номер образца	Метод амплификации	Молекулярный кариотип эмбриона	
		aCGH метод	NGS метод
1	WGA-PCR	+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-
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
11	«- »	XXY	N, XY
12	«- »	+4, XY	+4, XY
13	«- »	N, XY	N, XY
14	«- »	XXY	N, XX
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	WGA-PCR	N, XX	N, XX
32	«- »	N, XX	N, XX
33	«- »	гетероплоидный	гетероплоидный
34	«- »	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 данных таблицы 1 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. Эти различия вероятно обусловлены недостаточной эффективностью мечения продуктов амплификации при aCGH, вследствие чего возникает низкий уровень флуоресцентного сигнала.

Следует также отметить отличия в результатах, получаемых при использовании разных методов амплификации нуклеиновых кислот. В процессе настоящего исследования было установлено, что проведение MDA предпочтительнее, чем WGA-PCR, 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 WGA-PCR - 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.

Особенности мозаицизма эмбрионов

Проведен анализ трофэктодермы 17 эмбрионов с помощью метода CGH. Прежде всего использовали ПГТ-А. У всех эмбрионов установлено наличие анеуплоидий в связи с чем они не рекомендованы к переносу в полость матки. С супружескими парами проведено обсуждение о возможности использования этих эмбрионов в научных планах, получено письменное разрешение, оформлена необходимая документация. В последующем проведен повторный анализ методом NGS 3-х частей анеуплоидных эмбрионов: внутренней клеточной массы, образца трофэктодермы N 1 и образца трофэктодермы N 2. У 15 эмбрионов кариотип в исходном образце клеток трофэктодермы совпадал с образцами клеток, полученными при разделении эмбриона на три части. Однако у двух эмбрионов обнаружены дополнительные хромосомные нарушения в образце клеток из внутренней клеточной массы и трофэктодермы N1 и N2, представленные на рисунке 1 и 2.

Из рисунка 1 следует, что во всех образцах трофэктодермы эмбриона 12 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

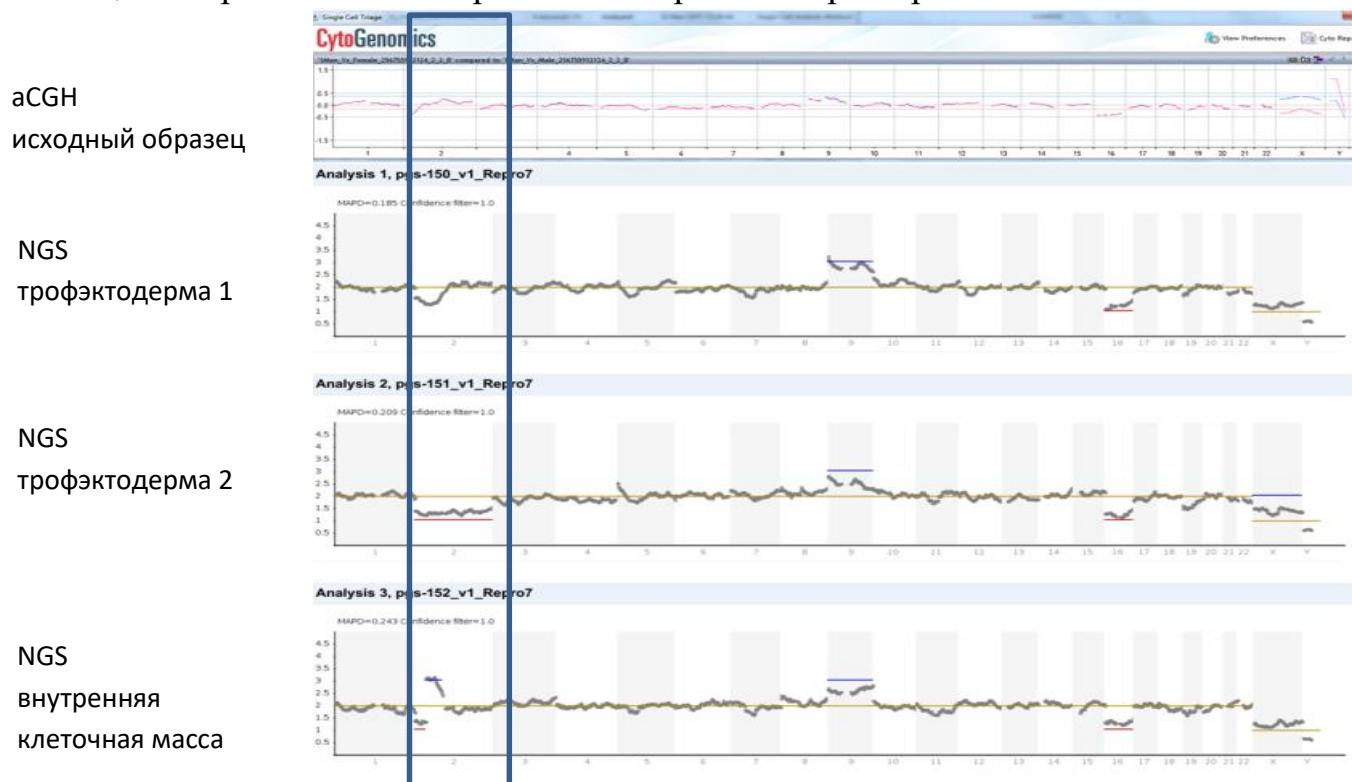


Рис. 1 Результат aCGH и NGS анализа исходной трофэктодермы, трофэктодермы образца N1, трофэктодермы образца N2 и внутренней клеточной массы эмбриона N 12.

Рисунок 2 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.

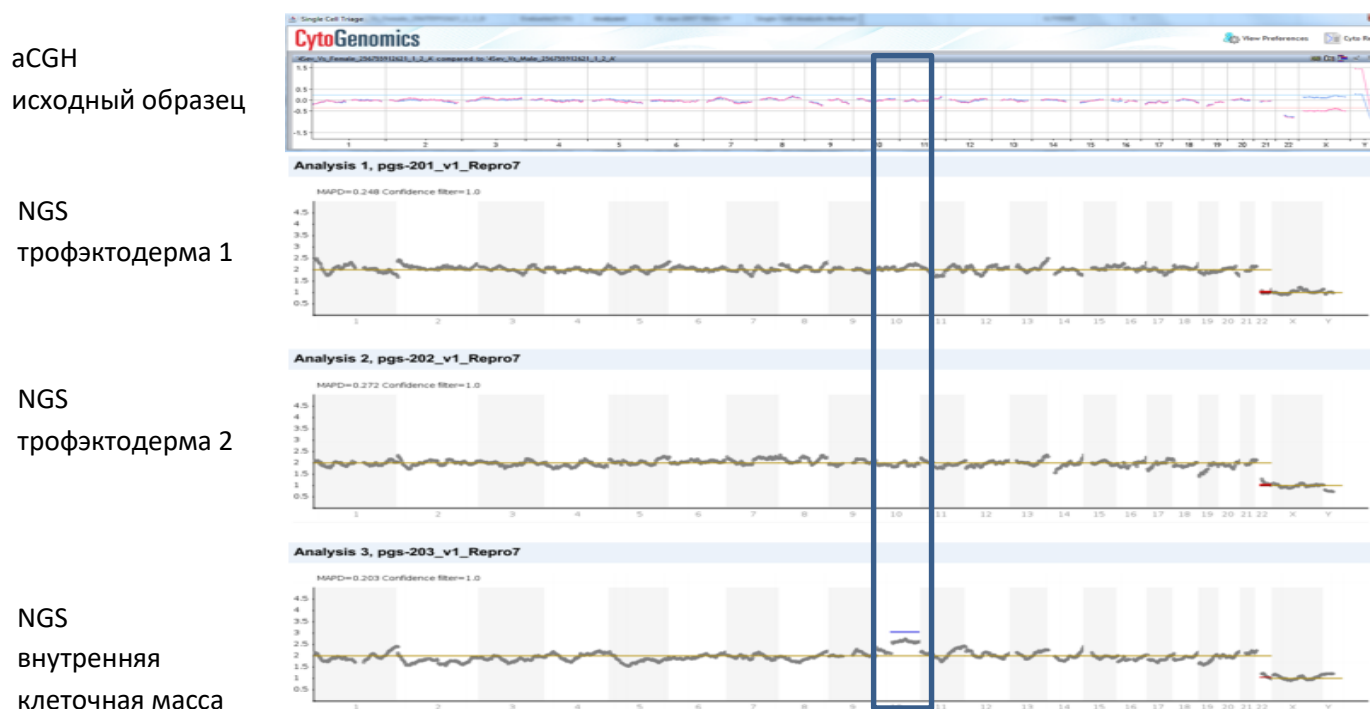


Рис. 2 Результат aCGH и NGS анализа исходной трофэктодермы, трофэктодермы образца N1, трофэктодермы образца N2 и внутренней клеточной массы эмбриона N 2.

Полученные данные свидетельствуют, что хромосомный набор клеток из разных структур эмбриона, может отличаться. Результаты исследования части трофэктодермы могут быть нерепрезентативны относительно всех ее клеток и внутриклеточной массы. Этот факт следует учитывать при определении эмбриона, подлежащего переносу, необходимости обследования женщины при наступлении беременности с помощью неинвазивных и инвазивных методов.

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 WGA-PCR, 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 (таблица 2). В таблице 2 представлены хромосомы и гены, для которых были подобраны соответствующие праймеры.

Таблица 2. 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 и с помощью всех представленных способами полногеномной амплификации.

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 (рис. 3, 4).

Анализ эмбрионов с помощью фрагментного анализа свидетельствует о возможности определения родительской принадлежности хромосом анеуплоидных эмбрионов.

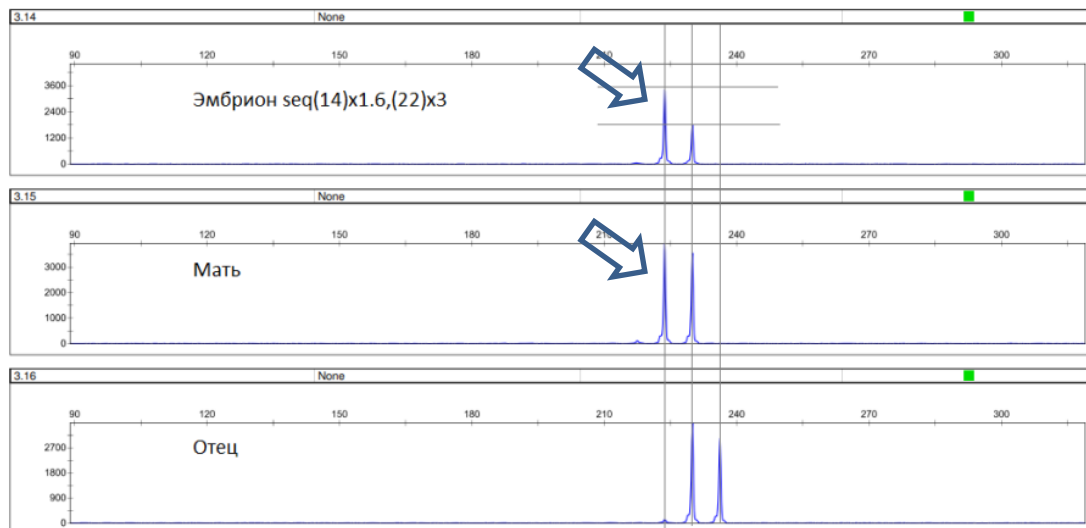


Рис. 3 Клинический пример материнского вклада в трисомию 22

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

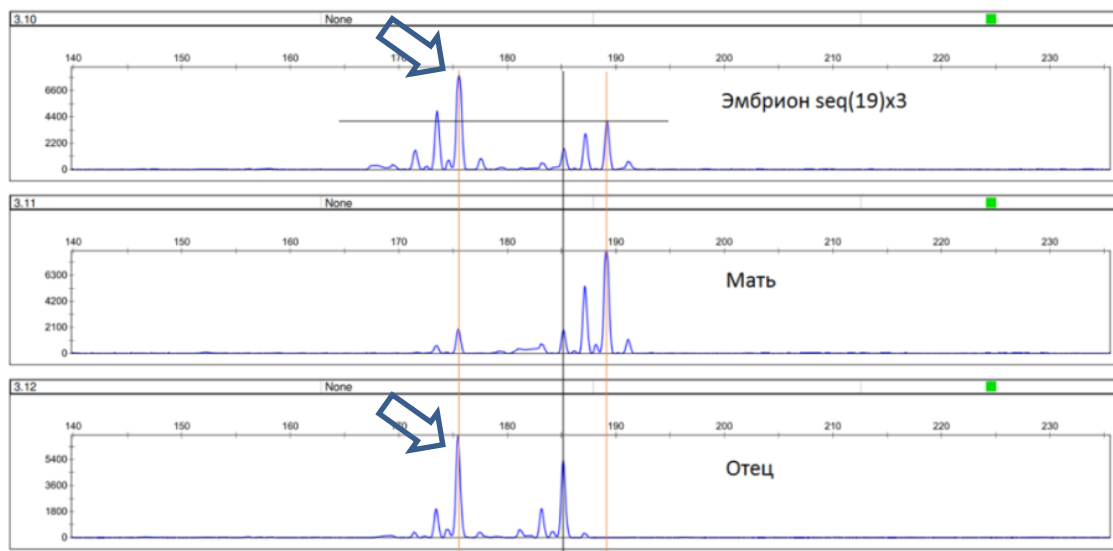


Рис. 4 Клинический пример отцовского вклада в трисомию 19

происхождении анеуплоидий использовать донорские ооциты; при отцовской-донорской сперме.

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 (Qiagen, США), в остальных случаях - WGA-PCR (Picoplex, США). 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

Таблица 3. Результаты комплексного применения ПГТА и ПГТ-М.

№	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 (3 носителя)
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	aCGH	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
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 носителя)
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
	ИТОГО:	93		55			38 (18 носителей)

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 3 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 3) 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.

Молекулярно-генетические исследования выявления дополнительных биомаркеров взаимосвязи с частотой анеуплоидий

Изучена взаимосвязь уровня копийности мтДНК с частотой анеуплоидий 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).

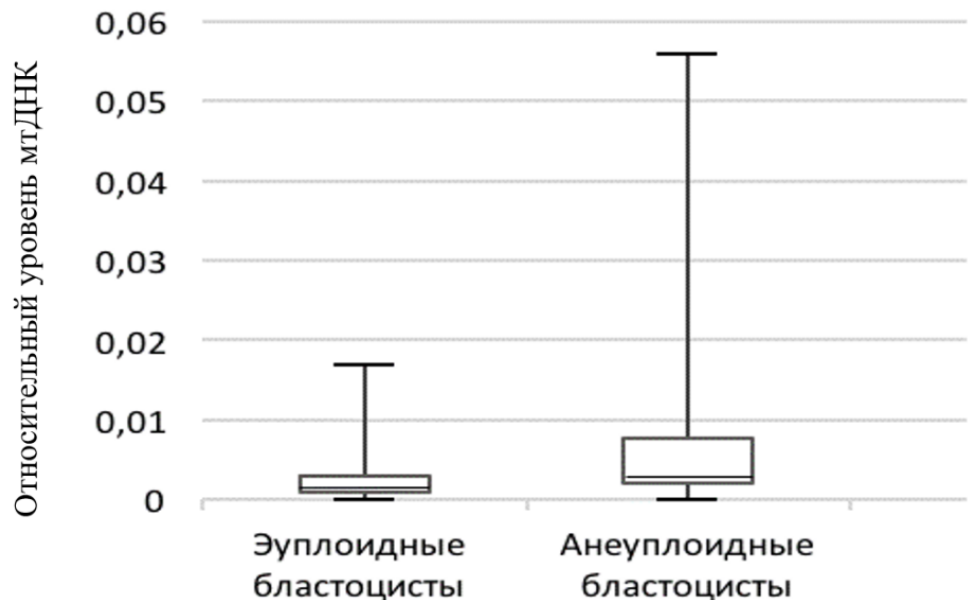


Рис. 5 Уровень копийности мтДНК у эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов.

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 5 представлен средний уровень мтДНК у эмбрионов с нормальным и патологическим хромосомным набором.

Установлено также, что копийность мтДНК, не зависимо от кариотипа эмбрионов, увеличивалась с возрастом женщин ($p=0,0038$). На рисунке 6 представлены эти параметры.

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.

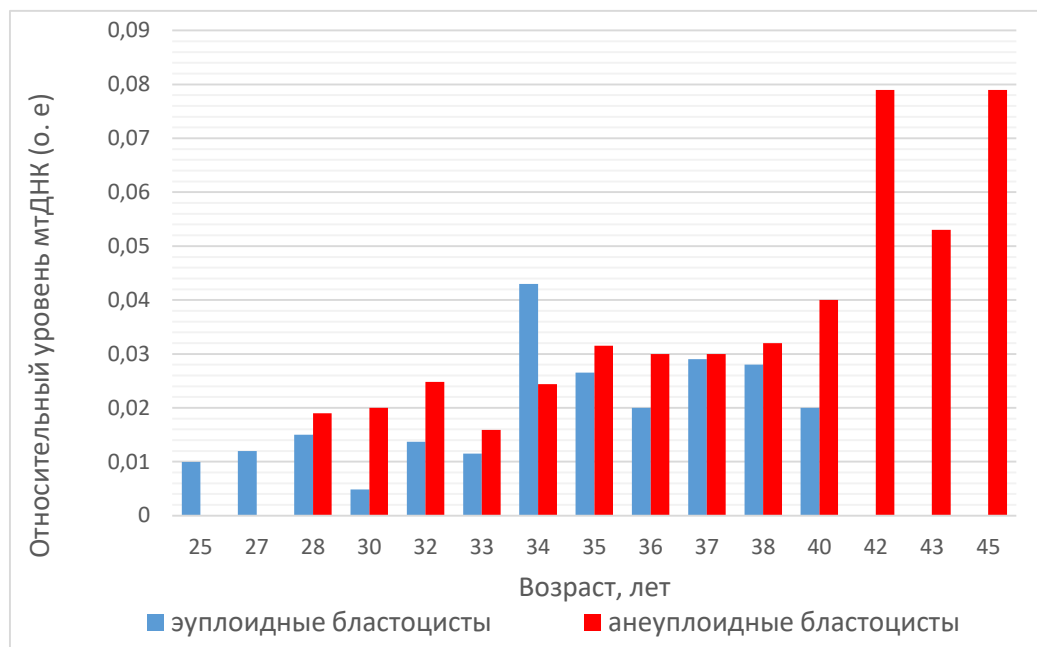


Рис. 6 Уровень мтДНК при нормальном и патологическом кариотипе эмбриона с учетом возраста пациенток.

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 (рис. 7). 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.

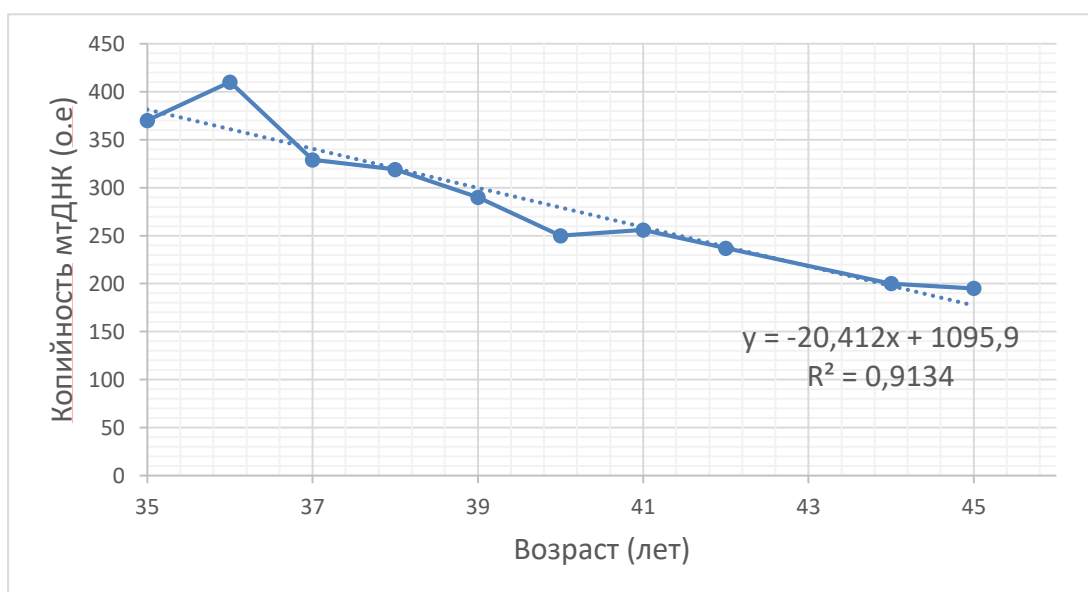


Рис. 7 Изменение уровней мтДНК в кумулюсных клетках с увеличением возраста пациенток.

Для изучения роли повышенного уровня фрагментации ДНК ядра сперматозоидов в возникновении анеуплоидий эмбрионов 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 аCGH.

Установлена статистически значимая зависимость между уровнем морфологически нормальных сперматозоидов мужчины и хромосомным набором эмбрионов (таблица 4).

Таблица 4. 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	27,83	58,41	0,0003
трисомии по аутосомам	48,57	25,55	0,0001
моносомии по аутосомам	46,29	26,47	0,0004
трисомии по половым хромосомам	7,2	3,49	0,0436
моносомии по половым хромосомам	1,17	1,32	0,485
делеции и дупликации	16,03	6,57	0,026

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 аCGH. Результаты исследования представлены в таблице 5.

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% ($p < 0,02$).

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 ($p < 0,001$).

Таблица 5. 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

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 в трофэктодерме и ооцит-кумулясных комплексах, 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Екимов А.Н.** Роль молекулярных методов диагностики анеуплоидий в предимплантационном скрининге эмбрионов (обзор литературы). / Екимова Е.В., Екимов А.Н., Алексеева М.Л. // Проблемы репродукции. 2012. Т. 18. № 6. С. 56-59.
2. **Екимов А.Н.** Первая беременность в России после проведения программы ЭКО и переноса эмбрионов, диагностированных с помощью сравнительной геномной гибридизации на чипах, в полость матки. / Сорвачева М.В., Екимов А.Н., Веюкова М.А., Екимова Е.В., Мишиева Н.Г., Аксененко А.А., Абубакиров А.Н., Трофимов Д.Ю., Барков И.Ю., Левков Л.А., Сухих Г.Т. // Акушерство и гинекология. 2013. № 5. С. 107-109.
3. **Екимов А.Н.** Результаты внедрения преимплантационного генетического скрининга на платформе Agilent в клиническую практику. / **Екимов А.Н.**, Екимова Е.В., Абубакиров А.Н., Трофимов Д.Ю. // Медицинские и социальные проблемы орфанных болезней: диагностика, лечение, профилактика. - Томск. - 2014 г. - 27-28 февраля.
4. **Ekimov A.N.** Results of the incorporation of the PGS using Agilent platform into the clinical practice. / **Ekimov AN**, Ekimova EV, Abubakirov AN, Trofimov DYu. // Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS) Annual Meeting - Кентербери, Великобритания. - 2014. - 29 апреля-2 мая.
5. **Екимов А.Н.** Предимплантационный генетический скрининг с помощью высокопроизводительного секвенирования. / Шубина Е.С., Коростин Д.О., **Екимов А.Н.**, Макарова Н.П., Александрова Н.В., Трофимов Д.Ю. // Сборник тезисов 3-ей Всероссийской научно-практической конференции по геномному секвенированию. - Москва. - 2015. - 14 мая.
6. **Екимов А.Н.** Предимплантационный генетический скрининг с помощью высокопроизводительного секвенирования. / Шубина Е.С., Коростин Д.О., **Екимов А.Н.**, Александрова Н., Макарова Н.П., Трофимов Д.Ю. // XXV Юбилейная

конференция РАРЧ "Репродуктивные технологии сегодня и завтра". - Сочи. - 2015. - 9-12 сентября.

7. **Ekimov A.N.** Comparison of the results of preimplantation genetic screening obtained by a-CGH and NGS methods from the same embryos. / Aleksandrova N., Shubina E., **Ekimov A.**, Kodyleva T., Mukosey I., Makarova N., Kulakova E., Levkov L., Trofimov D., Sukhikh G. // Gynecological Endocrinology. - 2016. - №S2. - с.1-4.

8. **Екимов А.Н.** Применение преимплантационного генетического скрининга у бесплодных супружеских пар: собственный опыт. / Зобова А.В., **Екимов А.Н.**, Беляева Н.А., Кулакова Е.В., Смольникова В.Ю., Владимирова И.В., Макарова Н.П., Калинина Е.А. // В сборнике: Репродуктивные технологии сегодня завтра. Материалы XXVI международной конференции РАРЧ "Репродуктивные технологии сегодня завтра". - 2016. - с.169-171.

9. **Ekimov A.N.** Preimplantation genetic screening using NGS. / Mukosey I.S., Shubina E.S., **Ekimov A.N.**, Kochetkova T.O., Aleksandrova N.V., Kodyleva T.A., Makarova N.P., Kulakova E.V., Levkov L.A., Trofimov D.Yu., Sukhikh G.T. // В книге: THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM SYSTEMS BIOLOGY AND BIOMEDICINE (SBioMed-2016). Abstracts. - 2016. - с.60.

10. **Екимов А.Н.** Сравнение результатов преимплантационного генетического скрининга, проведенного методами CGH и NGS. / Александрова Н.В., Шубина Е.С., **Екимов А.Н.**, Кодылева Т.А., Мукосей И.С., Макарова Н.П., Кулакова Е.В., Левков Л.А., Барков И.Ю., Трофимов Д.Ю., Сухих Г.Т. // Молекулярная биология. 2017. Т. 51. № 2. С. 308-313.

11. **Екимов А.Н.** Результаты преимплантационного генетического скрининга эмбрионов у супружеских пар с фрагментацией ДНК сперматозоидов. / Киселева Ю.Ю., Азова М.М., Кодылева Т.А., Ушакова И.В., Кириллова А.О., **Екимов А.Н.**, Ракитько А.С., Володяева Т.О., Мишиева Н.Г., Абубакиров А.Н. // Акушерство и гинекология. 2017. № 8. С. 104-108.

12. **Екимов А.Н.** Эффективность преимплантационного генетического скрининга у пациенток с привычным невынашиванием беременности и бесплодием. / Коротченкова О.Е., Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В., Калинина Е.А., Екимов А. // В сборнике: Мать и Дитя - 2017. Материалы форума. 2017. - с.170-171.

13. **Екимов А.Н.** Увеличение анеуплоидий эмбрионов ассоциировано с пониженной долей морфологически нормальных сперматозоидов. / Киселева Ю.Ю., Азова М.М., Кодылева Т.А., Кириллова А.О., **Екимов А.Н.**, Ракитько А.С., Мишиева Н.Г., Абубакиров А.Н. // Генетика. 2017. Т. 53. № 12. С. 1458-1462.

14. **Екимов А.Н.** Современные методы селекции эмбрионов при проведении программ вспомогательных репродуктивных технологий. / Королькова А.И., Мишиева Н.Г., Бурменская О.В., **Екимов А.Н.**, Абубакиров А.Н., Богатырева Х.А. // Акушерство и гинекология. 2018. № 2. С. 13-18.

15. **Екимов А.Н.** Эффективность преимплантационного генетического скрининга у пациенток с привычным невынашиванием беременности и бесплодием. / Коротченко О.Е., Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В., Кулакова Е.В., Докшукина А.А., **Екимов А.Н.** // Акушерство и гинекология. 2018. № 3. С. 64-69.

16. **Екимов А.Н.** Успешный опыт проведения преимплантационного генетического тестирования за 24 ч без повторной криоконсервации эмбрионов (клинический случай).

- / Кодылева Т.А., Аксененко А.А., Мишиева Н.Г., **Екимов А.Н.**, Мартазанова Б.А., Веюкова М.А., Абубакиров А.Н. // Проблемы репродукции. 2019. Т. 25. № 2. С. 78-82.
17. **Екимов А.Н.** Повышение эффективности программ ЭКО на основании определения копийности митохондриальной ДНК в трофэктодерме эмбрионов. / Королькова А.И., Мишиева Н.Г., Мартазанова Б.А., Бурменская О.В., **Екимов А.Н.**, Трофимов Д.Ю., Веюкова М.А., Кириллова А.О., Абубакиров А.Н. // Акушерство и гинекология. 2019. № 3. С. 98-104.
18. **Ekimov A.N.** Determination of mitochondrial DNA levels in human blastocysts as a predictor for embryonic implantation potential. / A. Korolkova, N. Mishieva, B. Martazanova, M. Veykova, A. Kirillova, O. Bourmenskay, **A. Ekimov**, A. Abubakirov // 35th Annual Meeting of the ESHRE. - Вена, Австрия. - 2019. - 24-26 июня.
19. **Екимов А.Н.** Значимость копийности митохондриальной ДНК в клетках кумулюса пациенток позднего репродуктивного возраста. / Королькова А.И., Мишиева Н.Г., Мартазанова Б.А., Бурменская О.В., Веюкова М.А., **Екимов А.Н.**, Трофимов Д.Ю., Абубакиров А.Н. // Акушерство и гинекология. 2019. № 10. С. 108-114.
20. **Ekimov A.N.** The first case report of the euploid blastocyst cryopreservation obtained after fertilization of in vitro matured ovarian tissue oocytes in a cancer patient. / Kirillova A., Kovalskaya E., Brovkina O., **Ekimov A.**, Bunyaeva E., Farmakovskaya M., Gordiev M., Mishieva N., Nazarenko T., Abubakirov A. // XV Ovarian Club meeting. - Гонконг. - 2019. - 14-15 декабря.
21. **Ekimov A.N.** Cryopreservation of euploid blastocysts obtained after fertilization of in vitro matured ovarian tissue oocytes: a case report. / Kirillova A., Kovalskaya E., **Ekimov A.**, Bunyaeva E., Mishieva N., Nazarenko T., Abubakirov A., Sukhikh G., Brovkina O., Gordiev M. // Journal of assisted reproduction and genetics. - 2020. - №4. - с. 905-911.
22. **Екимов А.Н.** Генотипирование эмбрионов с помощью фрагментного STR-анализа после проведения полногеномной амплификации. / **Екимов А.Н.**, Александрова Н.В., Шубина Е., Ритчер О.В., Гольцов А.Ю., Трофимов Д.Ю. // XXX ежегодная международная конференция РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра». - Москва. - 2020. - 8-12 сентября.
23. **Екимов А.Н.** Генотипирование эмбрионов с помощью фрагментного STR-анализа после проведения полногеномной амплификации. / **Екимов А.Н.**, Александрова Н.В., Шубина Е.С., Ритчер О.В., Гольцов А.Ю., Назаренко Т.А. // Акушерство и гинекология. 2021. № 1. С. 126-132.
24. **Екимов А.Н.** Предимплантационное генетическое тестирование с применением метода гаплотипирования с помощью однонуклеотидных полиморфизмов. / **Екимов А.Н.**, Каретникова Н.А., Шубина Е.С., Гольцов А.Ю., Кузнецова М.В., Мукосей И.С., Ритчер О.В., Трофимов Д.Ю. // Акушерство и гинекология. 2021. № 5. С. 100-107.
25. **Екимов А.Н.** Рождение двух здоровых детей у супружеской пары с гетерозиготным носительством мутации F508del в гене CFTR в программе вспомогательных репродуктивных технологий. / Кулакова Е.В., Довгань А.А., Драпкина Ю.С., Макарова Н.П., **Екимов А.Н.**, Калинина Е.А. // Профилактическая медицина. 2021. Т. 24. № 6. С. 75-78.
26. **Екимов А.Н.** Особенности мозаицизма у эмбрионов человека в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий. / Макарова Н.П.,

- Екимов А.Н.**, Кулакова Е.В., Драпкина Ю.С., Сысоева А.П., Краснова Н.А., Калинина Е.А. // Акушерство и гинекология. 2021. № 7. С. 144-151.
27. **Екимов А.Н.** Рождение здорового ребенка после переноса мозаичного эмбриона в программе экстракорпорального оплодотворения (клинические и этические аспекты). / Кулакова Е.В., Драпкина Ю.С., Алиева К.У., Зарецкая Н.В., **Екимов А.Н.**, Макарова Н.П., Сысоева А.П., Калинина Е.А. // Акушерство и гинекология. 2021. № 7. С. 210-214.
28. **Екимов А.Н.** Преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на анеуплоидии: возможности, проблемы и перспективы. / Савостина Г.В., Перминова С.Г., **Екимов А.Н.**, Веюкова М.А. // Акушерство и гинекология. 2021. № 11. С. 42-49.
29. **Екимов А.Н.** Оптимизация эмбриологического этапа в программах лечения бесплодия методами ВРТ с применением культуральных сред с гиалуроновой кислотой у супружеских пар с ПГТ-А. / Драпкина Ю.С., Кулакова Е.В., Непша О.С., **Екимов А.Н.**, Макарова Н.П., Калинина Е.А. // Акушерство и гинекология. 2021. № 11. С. 166-174.
30. **Екимов А.Н.** Влияние преимплантационного генетического тестирования на результаты программ вспомогательных репродуктивных технологий у супружеских пар с мужским фактором бесплодия. / Макарова Н.П., Лобанова Н.Н., Кулакова Е.В., Непша О.С., **Екимов А.Н.**, Калинина Е.А. // Акушерство и гинекология. 2021. № 11. С. 154-164.
31. **Екимов А.Н.** Использование митохондриальной ДНК эмбрионов в качестве предиктора эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий. / Непша О.С., Кулакова Е.В., **Екимов А.Н.**, Драпкина Ю.С., Макарова Н.П., Краевая Е.Е., Калинина Е.А. // Акушерство и гинекология. 2021. № 11. С. 125-134.
32. **Екимов А.Н.** Клинико-генетическое обследование семей, имеющих детей с врожденной тугоухостью. / Базанова М.В., Мачалов А.С., Кузнецов А.О., Барков И.Ю., **Екимов А.Н.** // X Петербургский форум оториноларингологов России: Материалы X Петербургского форума оториноларингологов России, Санкт-Петербург, 27–29 октября 2021 года. – Санкт-Петербург: ООО «Полифорум Групп», 2021. – С. 22.
33. **Екимов А.Н.** Преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с наружным генитальным эндометриозом. / Кулакова Е.В., Непша О.С., **Екимов А.Н.**, Драпкина Ю.С., Макарова Н.П., Ибрагимова Л.К., Сысоева А.П., Калинина Е.А. // Акушерство и гинекология. 2021. № 11. С. 104-112.
34. **Екимов А.Н.** Значение преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии в программах вспомогательных репродуктивных технологий. / Кулакова Е.В., Драпкина Ю.С., Макарова Н.П., **Екимов А.Н.**, Калинина Е.А. // Профилактическая медицина. 2022. Т. 25. № 2. С. 7-12.
35. **Екимов А.Н.** Значение ооцитарного фактора в развитии бесплодия неясного генеза. / Киракосян Е.В., **Екимов А.Н.**, Павлович С.В. // Акушерство и гинекология. 2022. № 1. С. 14-21.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

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.