



# Роль метода высокопроизводительного секвенирования при преимплантационном генетическом тестировании в выявлении генетических изменений у пациентов программы ЭКО

Ж.И. Глинкина<sup>1</sup>, Е.В. Кулакова<sup>2</sup>, И.И. Витязева<sup>3</sup>, Е.И. Померанцева<sup>4</sup>, Н.В. Опарина<sup>5</sup>, В.С. Кузьмичева<sup>6</sup>

<sup>1</sup> ООО «Хайтек Генетикс»; Россия, г. Москва

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, г. Москва

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, г. Москва

<sup>4</sup> ООО «МЦ Новая Жизнь»; Россия, г. Москва

<sup>5</sup> ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского»; Россия, г. Москва

<sup>6</sup> ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»; Россия, г. Москва

## РЕЗЮМЕ

**Цель статьи:** показать эффективность преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) методом высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina у пациентов с отягощенным акушерским анамнезом на примере случаев из практики.

**Основные положения.** Исследование кариотипа у пациентов с нарушением репродуктивной функции (НРФ) — это «золотой стандарт» и необходимый этап обследования супружеских пар перед планированием беременности. Самым современным методом генетического тестирования эмбрионов, который может определять анеуплоидии и несбалансированные хромосомные патологии одновременно, является метод высокопроизводительного секвенирования (Next Generation Sequencing, NGS).

В данной статье представлены два клинических случая проведения ПГТ методом NGS у супружеских пар с НРФ. На момент включения пар в программу вспомогательных репродуктивных технологий в одной из них был определен нормальный кариотип супругов, в другой у женщины отмечали реципрокную транслокацию между 2 и 7 хромосомами: 46,XX,t(2;7)(p21;q36). Однако обследование эмбрионов этих пар показало, что изначально кариотипы женщин были определены неверно.

**Заключение.** При НРФ знание точек разрыва при хромосомных перестройках имеет принципиальное значение, т. к. от них может зависеть выбор метода последующей генетической диагностики у эмбриона. Метод высокопроизводительного секвенирования на платформе компании Illumina может быть успешно применен у пациентов с изменениями в кариотипе, даже в случае, когда кариотип родителей определен неправильно или неизвестен.

**Ключевые слова:** высокопроизводительное секвенирование, Next Generation Sequencing, нарушение репродуктивной функции, хромосомные перестройки.

**Вклад авторов:** Глинкина Ж.И. — проведение генетического исследования и интерпретация полученных данных (преимплантационное генетическое тестирование), консультирование пациентов программы ВРТ с преимплантационным генетическим тестированием, написание текста статьи и утверждение рукописи для публикации; Кулакова Е.В., Кузьмичева В.С. — проведение программы ВРТ; Витязева И.И., Померанцева Е.И. — проведение программы ВРТ, написание текста статьи; Опарина Н.В. — проведение цитогенетического исследования у пациентов по лимфоцитам крови.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

**Для цитирования:** Глинкина Ж.И., Кулакова Е.В., Витязева И.И., Померанцева Е.И., Опарина Н.В., Кузьмичева В.С. Роль метода высокопроизводительного секвенирования при преимплантационном генетическом тестировании в выявлении генетических изменений у пациентов программы ЭКО. Доктор.Ру. 2021; 20(1): 26–32. DOI: 10.31550/1727-2378-2021-20-1-26-32

Глинкина Жанна Ивановна (**автор для переписки**) — д. б. н., генеральный директор ООО «Хайтек Генетикс». 119532, Россия, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 111, кор. 1. E-mail: janna435@yandex.ru

Кулакова Елена Владимировна — к. м. н., старший научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: evkulakova@mail.ru

Витязева Ирина Ивановна — д. м. н., заведующая лечебно-диагностическим отделением вспомогательных репродуктивных технологий ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. 117036, Россия, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11. E-mail: vitiazeva@yandex.ru

Померанцева Елена Игоревна — к. м. н., врач акушер-гинеколог ООО «МЦ Новая Жизнь». 127018, Россия, г. Москва, ул. Советской армии, д. 7. E-mail: direktor@new-life.ru

Опарина Наталья Вячеславовна — врач лабораторный генетик медико-генетической лаборатории Медико-генетического центра ГБУЗ МО «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского». 129110, Россия, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2. E-mail: nv\_oparina@mail.ru

Кузьмичева Варвара Сергеевна — аспирант ГБУЗ МО МОНИИАГ. 101000, Россия, г. Москва, ул. Покровка, д. 22А. E-mail: barbarakuzmicheva@gmail.com

# The Role of High Throughput Sequencing in Pre-implantation Genetic Testing for Identification of Genetic Variations in IVF Patients

Zh.I. Glinkina<sup>1</sup>, E.V. Kulakova<sup>2</sup>, I.I. Vityazeva<sup>3</sup>, E.I. Pomerantseva<sup>4</sup>, N.V. Oparina<sup>5</sup>, V.S. Kuzmicheva<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Hi-Tech Genetics; 111/1 Leninskiy Prosp., Moscow, Russian Federation 119532

<sup>2</sup> V.I. Kulakov National Medical Scientific Centre of Obstetrics, Gynecology and Perinatal Medicine of the Ministry of Health of the Russian Federation; 4 Academician Oparin Str., Moscow, Russian Federation 117997

<sup>3</sup> National Medical Research Centre of Endocrinology of the Ministry of Health of the Russian Federation; 11 Dmitry Ulyanov Str., Moscow, Russian Federation 117036

<sup>4</sup> Novaya Zhizn Medical Centre; 7 Sovetskoy Armii Str., Moscow, Russian Federation 127018

<sup>5</sup> M.F. Vladimirsky Moscow Regional Clinical Research Institute (a Government-funded Healthcare Institution); 61/2 Shchepkin St., Moscow, Russian Federation 129110

<sup>6</sup> Moscow Regional Scientific Centre of Obstetrics and Gynaecology, Moscow, Russian Federation 101000

## ABSTRACT

**Objective of the Paper:** To demonstrate the efficiency of pre-implantation genetic testing (PGT) with Illumina high throughput sequencing in patients with aggravated obstetric and gynaecological history (as exemplified by case reports).

**Key Points.** The study of the karyotype in patients with reproduction disorders function (RFD) is a golden standard and a mandatory step in examination of couples who plan for pregnancy. The most advanced method for genetic testing of embryos allowing simultaneous identification of aneuploidies and unbalanced chromosomal pathologies is the method of high throughput sequencing (Next Generation Sequencing, NGS).

In this article, we describe two cases of PGT with NGS in couples with RFD. When the couples were enrolled into the assisted reproductive technology program, one couple had normal karyotype; and in the other couple, the woman had reciprocal translocation between 2 and 7 chromosomes: 46,XX,t(2;7)(p21;q36). However, examination of the embryos in these couples demonstrated that initially karyotypes of the women had been incorrectly identified.

**Conclusion.** In RFD, awareness of the break points in chromosome rearrangements is potentially important, because they can greatly impact selection of the method for subsequent genetical testing of the embryo. Illumina high throughput sequencing can be successfully used in patients with karyotype alternations, even if the parent karyotype is identified incorrectly or is unknown.

**Keywords:** high throughput sequencing, Next Generation Sequencing, reproduction function disorders, chromosome rearrangements.

**Contributions:** Glinkina, Zh.I. — genetic examination and data interpretation (pre-implantation genetic testing), patient ART counselling with pre-implantation genetic testing, text of the article, approval of the manuscript for publication; Kulakova, E.V. and Kuzmicheva, V.S. — ART program implementation; Vityazeva, I.I. and Pomerantseva, E.I. — ART program implementation, text of the article; Oparina, N.V. — cytogenetic assay (blood lymphocytes).

**Conflict of interest:** The authors declare that they do not have any conflict of interests.

**For citation:** Glinkina Zh.I., Kulakova E.V., Vityazeva I.I., Pomerantseva E.I., Oparina N.V., Kuzmicheva V.S. The Role of High Throughput Sequencing in Pre-implantation Genetic Testing for Identification of Genetic Variations in IVF Patients. Doctor.Ru. 2021; 20(1): 26–32. (in Russian). DOI: 10.31550/1727-2378-2021-20-1-26-32

## ВВЕДЕНИЕ

Новые молекулярно-генетические методы находят все более широкое применение в клинической медицинской практике. Это связано с тем, что с их использованием открываются новые возможности в диагностике и профилактике генетических заболеваний, в понимании механизмов их развития, а также возможность подбора индивидуальной схемы лечения для конкретного человека.

Одним из направлений применения молекулярно-генетических исследований является выявление хромосомных болезней (ХБ), этиологическая причина которых — нарушение количества или структуры хромосом. ХБ занимают одно из ведущих мест среди причин врожденной и наследственной патологии и зачастую проявляются тяжелыми инвалидирующими состояниями у ребенка [1].

Однако сбалансированные хромосомные перестройки (СХП) чаще всего фенотипически нейтральны для носителей и проявляются бесплодием, ранними репродуктивными потерями или рождением ребенка с хромосомной патологией. Это обусловлено тем, что в мейозе у носителей СХП возможно формирование несбалансированных гамет и, как следствие, эмбриона с полной анеуплоидией или сегментарными нарушениями генетического материала [2].

Обнаружение структурных хромосомных перестроек у эмбриона или плода служит показанием для кариотипирования супругов, если раньше им его не проводили [3]. По различным данным, от 1,8% до 8% [4, 5] пациентов с нарушением репродуктивной функции (НРФ) являются носителями различных ХП, самые частые из которых — транслокации. Частота носителей транслокаций оценивается как 1 на 600 супружеских пар [6].

Таким образом, исследование кариотипа у пациентов с НРФ — «золотой стандарт» и необходимый этап обследования супружеских пар перед планированием беременности. Это тем более важно, поскольку, несмотря на появление новых геномных технологий, кариотипирование — один из немногих инструментов, способных выявлять СХП. Тем не менее, являясь отправной точкой в лабораторной диагностике репродуктивных проблем, стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) — трудоемкий процесс, связанный с длительным культивированием клеток крови. В настоящее время отсутствует автоматизация процесса получения метафазных хромосом.

Большое значение в кариотипировании имеет субъективизм исследователя. Все эти факторы могут стать причинами ошибок в исследовании кариотипа. В ряде случаев выявить

точную ХП у пары с НРФ возможно только после обследования их эмбрионов или абортного материала.

Классическим методом профилактики рождения больного ребенка у пациентов с ХП является пренатальная генетическая диагностика, которая осуществляется во время беременности, в случае если эта беременность сохранится до срока ее проведения. При выявлении у плода аномального кариотипа беременность прерывают, что наносит вред репродуктивному и психологическому здоровью женщины. Поэтому в последнее время пациентам с изменениями в кариотипе предлагают пройти программу ЭКО с преимплантационным генетическим тестированием структурных перестроек (ПГТ-СП) у эмбрионов до переноса их в полость матки женщины.

Самым современным методом генетического тестирования эмбрионов, который может определять анеуплоидии и несбалансированные хромосомные патологии одновременно, является метод высокопроизводительного секвенирования (Next Generation Sequencing, NGS). Сейчас он все больше вытесняет другие методы ПГТ и активно внедряется в широкую практику клиник ВРТ за рубежом и в России. ПГТ-СП методом NGS завоевывает все большую популярность при диагностике хромосомной патологии у эмбрионов пациентов с абберациями кариотипа.

На успешное использование NGS у пациентов с НРФ указывают многочисленные публикации авторов из разных стран, которые показали, что ПГТ методом NGS повышает эффективность программы ВРТ у пациентов не только с измененными кариотипами, но и с неудачными программами ЭКО в анамнезе, при невынашивании беременности, у других групп больных с НРФ и даже у фертильных супружеских пар [7].

Принцип метода NGS основан на определении последовательности нуклеиновых кислот, что отличает его от других методов и делает самым точным при проведении ПГТ.

В данной статье представлены два клинических случая проведения ПГТ методом NGS у супружеских пар с НРФ. На момент включения пар в программу ВРТ в одной из них был определен нормальный кариотип супругов, в другой у женщины отмечали реципрокную транслокацию между 2 и 7 хромосомами: 46,XX,t(2;7)(p21;q36).

СЦИ выполняли на фитогемагглютинин-стимулированных лимфоцитах периферической крови, культивированных 72 часа в соответствии с принятым протоколом [8]. Для визуализации бэндинга хромосом использовали метод GTG-окрашивания. Анализировали от 11 до 30 метафазных пластинок.

Для визуализации метафазных GTG-окрашенных хромосом применяли микроскоп Nikon Eclipse Ci (Nikon Corporation, Япония) с программным обеспечением «ВидеоТест-Карио 3.1» («Видеотест», Россия).

Результаты исследований записывали в соответствии с Международной номенклатурой [9].

Для проведения ПГТ эмбрионов использовали реагенты (VeriSeq PGS Kit) и программу анализа полученных данных секвенирования (программное обеспечение (ПО) BlueFuse Multi). Данное решение позволило провести исследование от получения ДНК из клеток трофэктодермы и пробоподготовки до биоформатического анализа полученных данных (ПО BlueFuse Multi).

Показатель качества подготовки образцов — концентрация полученной двухцепочечной библиотеки. Показателем качества исходного образца и в конечном счете качества полученных данных является ряд параметров, отображаемых в ПО для анализа результатов: количество и качество

данных, полученных в запуске, абсолютное количество прочтений для каждого образца, эффективность выравнивания ридов и т. д.

ПГТ осуществлялось методом NGS на приборе MiSeq компании Illumina с применением коммерческого набора VeriSeq PGS Kit. Результаты, полученные прибором, обрабатывали с помощью ПО BlueFuse Multi.

Для тестирования брали клетки 5–6-дневных эмбрионов, полученных в программе ВРТ. Все эмбрионы были получены после оплодотворения методом ИКСИ. Перед секвенированием осуществляли полногеномную амплификацию ДНК клеток трофэктодермы. Анализ качества полученного продукта WGA проводили с помощью электрофореза.

### КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ 1

*Пациентка С.В.В.*, 1985 г. р., впервые обратилась в отделение ВРТ в сентябре 2014 года с жалобами на невынашивание беременности и ненаступление беременности в течение последнего года.

Менструальная функция: менструации с 13 лет, установились сразу, через 30 дней, по 6–7 дней, регулярные, умеренные, безболезненные.

Беременностей три, все закончившиеся самопроизвольными абортами в 2008, 2009, 2013 годах, анэмбриония. Цитогенетический анализ ткани абортусов не проводился.

Гинекологические операции: лапароскопия в июне 2008 года, удаление параовариальной кисты диаметром 5 см справа. Маточные трубы и яичники не изменены.

Брак первый, в течение 10 лет. Детей у мужа 35 лет нет. В спермограмме отмечали нормозооспермию.

Кариотип супругов на момент включения в программу ВРТ нормальный: муж — 46,XY, жена — 46,XX.

У женщины проведены три программы ВРТ: две со своими яйцеклетками и одна с донорскими.

*Протокол ЭКО № 1.* Короткий протокол. При трансвагинальной пункции (ТВП) получены 14 ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК), из которых 5 развились до бластоцисты к 5-му дню. На 5-е сутки развития была проведена биопсия трофэктодермы с последующей витрификацией методом Китазато. Перенос эмбрионов в стимулированном цикле не проводился.

Результат исследования хромосомного набора методом NGS 5 эмбрионов показал наличие 2 здоровых эмбрионов на день исследования: один мужского пола, другой — женского. В остальных эмбрионах выявлена анеуплоидия различных хромосом или сегментов (*табл. 1*).

Таблица 1 / Table 1

#### Результаты исследования 5 эмбрионов

*пациентки С.В.В.*

Examination results for 5 embryos of patient S.V.V.

№ пробирки / Tube No.	Результаты секвенирования / Sequencing results
1	Seq(8)×1,(X)×2
2	Seq(1p36.33->1p12)×1,(21)×1,(22)×3,(X)×2
3	Seq(1-22,X)×2
4	Seq(1-22)×2,(XY)×1
5	Seq(1q32.1->1q44)×1,(8q22.3->8q24.3)×3,(XY)×1

В одном эмбрионе обнаружена одна копия участка хромосомы 1 и три копии участка хромосомы 8 (рис. 1В), но с учетом того, что кариотип был в норме, данную патологию приняли за случайную мутацию *de novo*, что часто отмечают у преимплантационных эмбрионов.

Перенос в последующем цикле эмбриона женского пола закончился наступлением беременности, которая в 5–6 недель остановилась в развитии. Инструментальное удаление ее не проводилось.

Перенос эмбриона мужского пола закончился беременностью, которую пришлось прервать медикаментозно в 11–12 недель по медицинским показаниям. УЗИ показало множественные пороки развития плода (МВНР): мегацистис и вторичный гидронефроз по типу синдрома prune-belly, омфаломезентериальную кисту пуповины; единственную артерию пуповины, гипоплазию носовой кости; субамниотическую и субхориальную гематомы как признаки начавшегося прерывания беременности.

Генетическое исследование тканей абортуса методом NGS выявило нормальный молекулярный кариотип, как и во время проведения ПГТ: seq(1-22)×2,(XY)×1. Дополнительно произведено полноэкзомное секвенирование, оно не показало патогенные мутации, которые могли быть причиной МВНР.

*Протокол ЭКО № 2.* Длинный протокол. При ТВП фолликулов получен 21 ОКК. На 5-й день развития для ПГТ были пригодны 8 эмбрионов. Полногеномная амплификация образцов показала, что один не пригоден для секвенирования (рис. 1). Тестирование остальных выявило один пригодный к переносу эмбрион женского пола. В остальных найдены различные хромосомные патологии. В 4 эмбрионах отмечена закономерная патология, которая могла указывать на наличие сбалансированной хромосомной транслокации у одного из родителей (табл. 2).

Было принято решение о повторном исследовании кариотипа пациентов уже с указанием врачу-цитогенетику выявленных точек разрыва хромосом в клетках эмбриона. Повторное исследование обнаружило у супруги сбалансированную транслокацию между хромосомами 1 и 8: 46,XX,t(1;8)(q32;q22).

Несмотря на то что секвенирование показало наличие одного здорового эмбриона, супруги решили использовать в дальнейшем в программе ВРТ донорские ооциты с ПГТ.

*Протокол ЭКО с донорскими ооцитами.* Разморожены и оплодотворены методом ИКСИ 8 донорских ооцитов. На 5-й день развития получены 4 эмбриона, двум из которых проведено ПГТ. Результат подтвердил, что оба эмбриона

Рис. 1. Примеры анализов результатов секвенирования клеток трофобласта методом высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina в программе BlueFuse Multi у пациентки С.В.В. А и В — профиль хромосом; С и D — размеры участков с делецией и дупликацией

Fig. 1. Analyses examples for trophoblast cells sequencing results using Illumina high throughput sequencing and BlueFuse Multi software in patient S.V.V. A and B — chromosome profile; C and D — sites with deletion and duplications

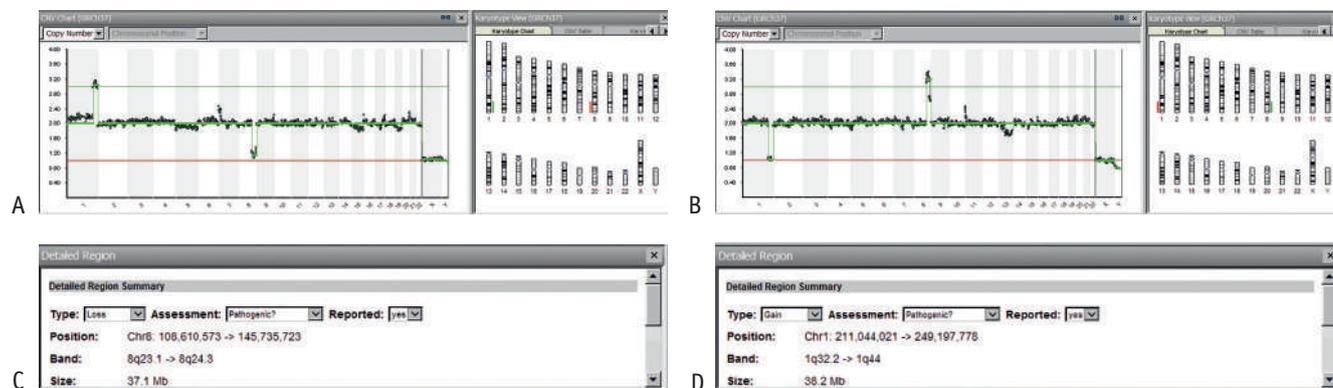


Таблица 2 / Table 2

Результаты исследования 8 эмбрионов пациентки С.В.В.  
Examination results for 8 embryos of patient S.V.V.

№ пробирки / Tube No.	Результаты секвенирования / Sequencing results
1	Секвенирование не проводилось по причине наличия деградированной ДНК в образце / Sequencing was not performed because of degraded DNA in the sample
2	Seq(4)×1~2,(1q32.2-1q44)×1,(8q23.1-8q24.3)×3,(X)×2
3	Seq(8p23.3-8q23.1)×1,(3p26.3-3p14.1)×1~2,(1p36.33-1q32.2)×3,(XY)×1
4	Seq(8)×3,(XY)×1
5	Seq(1q32.2-1q44)×3,(8q23.1-8q24.3)×1,(XY)×1
6	Seq(1q32.2-1q44)×1,(8q23.1-8q24.3)×3,(XY)
7	Seq(1q32.2-1q44)×4,(8q23.1-8q24.3)×1,(8p23.3-8q23.1)×3,(X)×2
8	Seq(1-22,X)×2

пригодны к переносу. Последующий перенос эмбриона мужского пола закончился наступлением беременности, которая завершилась в 2019 году рождением здорового мальчика весом 3668 г и ростом 54 см.

**КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ 2**

Пациентка К.М.А., 14.08.1986 г. р., наблюдалась в отделении ВРТ с 2013 года с диагнозом «бесплодие 2». На момент включения пациентки в программу ЭКО было известно о наличии в ее кариотипе сбалансированной хромосомной транслокации с участием хромосом 2 и 7: 46,XX,t(2;7)(p21;q36). На исследование кариотипа супружескую пару направили в связи с тем, что в анамнезе была отмечена неразвивающаяся беременность на сроке 6–7 недель. Исследование материала абортуса FISH-методом показало: пол — женский, XX. Анеуплоидии по маркерам для хромосом 13, 14, 16, 18, 21 и 22 не выявлены.

У женщины отмечали спаечный процесс в полости малого таза; хронический эндометрит вне обострения; гипоплазию матки I ст.; мультифолликулярные яичники; хронический цистит вне обострения; атопический дерматит.

Менструальная функция: менструации с 15 лет, установились сразу, по 5 дней, через 30–32 дня, умеренные, безбо-

лезненные, регулярные. Принимала оральные контрацептивы непрерывно в течение 5 лет.

Беременность одна, остановилась в развитии на сроке 6–7 недель. Произведены удаление остатков плодного яйца и выскабливание стенок полости матки, затем бужирование цервикального канала и офисная гистероскопия.

У пациентки проведена одна программа ВРТ по короткому протоколу. При ТВП получены 16 ОКК. На 5-е сутки развития пригодных для биопсии эмбрионов было 8, после биопсии они были криоконсервированы.

По результатам ПГТ (табл. 3) к переносу рекомендованы 2 эмбриона: мужского и женского пола. В остальных эмбрионах наблюдали несбалансированную транслокацию участков хромосом 2 и 7 (рис. 2А и 2В) и/или другие хромосомные нарушения. Однако точки разрыва в эмбрионах не совпадали с точками разрыва в кариотипе женщины (рис. 2С, 2Д). Принято решение о повторном кариотипировании с указанием точек разрыва, выявленных в эмбрионах. В результате повторного исследования хромосомного набора у женщины определены такие же точки разрыва, как у эмбрионов: 46,XX,t(2;7)(p11.2;q31.2).

При последующим переносе эмбриона женского пола беременность не наступила. Перенос эмбриона мужского

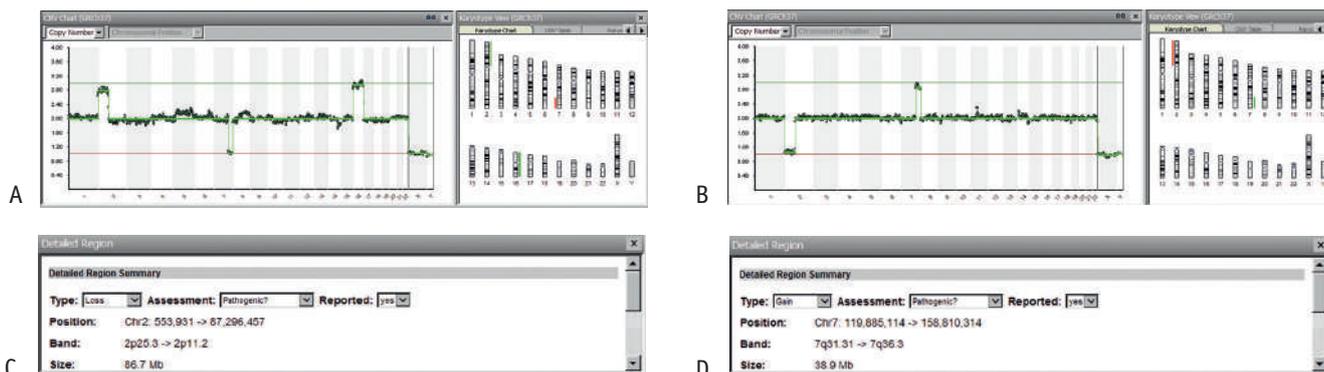
Таблица 3 / Table 3

Результаты исследования 8 эмбрионов пациентки К.М.А.  
Examination results for 8 embryos of patient K.M.A.

№ пробирки / Tube No.	Результаты секвенирования / Sequencing results
1	Seq(2p25.3-2p11.2)×3,(7q31.31-7q36.3)×1,(16)×3,(XY)×1
2	Seq(15)×1,(11p15.5-11p11.2)×1~2,(XY)×1
3	Seq(12)×1,(7)×1~2,(XY)×1
4	Seq(1-22)×2,(XY)×1
5	Seq(2p25.3-2p11.2)×3,(7q31.31-7q36.3)×1,(X)×2
6	Seq(2p25.3-2p11.2)×1,(7q31.31-7q36.3)×3,(XY)×1
7	Seq(1-22,X)×2
8	Seq(16)×1,(XY)×1

Рис. 2. Примеры анализов результатов секвенирования клеток трофобласт методом высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina в программе BlueFuse Multi у пациентки К.М.А. А и В — профиль хромосом; С и D — размеры участков с делецией и дупликацией

Fig. 2. Analyses examples for trophoblast cells sequencing results using Illumina high throughput sequencing and BlueFuse Multi software in patient K.M.A. A and B — chromosome profile; C and D — sites with deletion and duplications



пола закончился наступлением беременности, которая завершилась в 2019 году рождением здорового мальчика массой 3800 г и ростом 52 см.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в литературе имеются многочисленные публикации, которые доказывают, что изменения в кариотипе пациентов могут быть причиной различных НРФ человека: от бесплодия, невынашивания беременности до рождения ребенка с генетическими нарушениями. Поэтому таким больным в рамках программы ВРТ уделяется особое внимание и всегда рекомендуется проведение ПГТ, потому что одной визуализации морфологии эмбриона недостаточно для вывода о его генетическом здоровье.

S. Munné и соавт. проанализировали исходы программ ВРТ 34 клиник и 9 лабораторий США, Канады, Англии и Австралии в группах женщин, у которых оценивали перед переносом только морфологию эмбрионов, и в группе, где также исследовали генетический статус эмбрионов. Для чистоты исследования эмбрионы с выявленным мозаицизмом в 16,8% случаев не использовались для переноса.

Анализ показал, что в группе пациенток старше 35 лет, где проводилось ПГТ, отмечалось значительное улучшение исходов программ ВРТ: частота рождения здоровых детей составила 51% против 37% в группах только с визуализацией эмбрионов [10].

Современные молекулярно-генетические методы находят все более широкое применение в медицинской практике у пациентов с генетическими изменениями, особенно в тех случаях, когда классические методы исследования не могут выявлять причину заболевания. Возможное одновременное исследование всех 24 хромосом сделало прорыв в ПГТ. До недавнего времени применяли, а в некоторых клиниках до сих пор применяют метод аCGH (сравнительную геномную гибридизацию), который позволяет исследовать 24 хромосомы. В основе метода лежит гибридизация ДНК на чипах. Однако NGS имеет ряд преимуществ перед этим методом.

J. Friedenthal и соавт. сравнивали исходы 916 программ ВРТ при переносе единичных размороженных зуплоидных эмбрионов, исследованных методами аCGH и NGS: частоту имплантации, биохимических беременностей, спонтанных абортов и рождения детей. Результаты исследования показали, что частота имплантации была значительно выше, когда исследование проводили методом секвенирования (71,6% против 64,6%). Частота рождения детей была также выше (62% против 54,4%).

Стоит отметить, что частота биохимических беременностей оказалась значительно выше при применении метода аCGH (15,1% против 8,7%). Авторы сделали заключение, что тестирование эмбрионов методом NGS дает более высокие показатели исходов программ ВРТ, чем аCGH, т. к. секвенирование имеет возможность лучше выявлять мозаицизм,

делеции и дупликации, влияющие на жизнеспособность эмбрионов, и тем самым исключать перенос эмбрионов с генетическими особенностями [11].

Секвенирование нового поколения изменяет известные представления о причинах возникновения НРФ. Знание точной причины НРФ у конкретной супружеской пары имеет принципиальное значение, т. к. это определяет тактику ведения пациентов и в зависимости от причин, вызывающих НРФ, может изменить алгоритм лечения. В ряде случаев пациенты хотят использовать программу с донорскими клетками как в нашем наблюдении № 1.

Результаты нашей работы еще раз подтверждают, что ПГТ необходимо проводить пациентам с отягощенным акушерским анамнезом, так это может помочь в нахождении причин НРФ у конкретной супружеской пары (наблюдение № 1). Если бы основывались только на данных кариотипа, которые изначально определили как норму, и не провели ПГТ дважды, то выяснить причину НРФ в данном случае не удалось бы. Кроме того, в рамках программы ВРТ у пары, помимо невынашивания беременности, мог родиться ребенок с ХП. Поэтому пациенты должны иметь полную информацию о причинах своих НРФ и только самостоятельно принимать решение, по какому алгоритму лечения они пойдут.

При проведении ПГТ необходимо обращать внимание и на возраст пациенток, так как у женщин старше 35 лет, помимо генетического груза, связанного с изменениями кариотипа, дополнительно повышается риск возникновения различных анеуплоидий у эмбрионов, не вовлеченных в транслокацию, как было отмечено в обоих наших наблюдениях. Перенос таких эмбрионов может привести к высокому риску невынашивания беременности и рождению больного ребенка.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Собственные результаты и зарубежные данные показали, что точность преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) зависит от метода, которым оно проводится, и что метод высокопроизводительного секвенирования на платформе компании Illumina может быть успешно применен у пациентов с изменениями в кариотипе, даже в случае, когда кариотип родителей определен неправильно или неизвестен [10, 11]. При нарушении репродуктивной функции знание точек разрыва имеет принципиальное значение, т. к. от них может зависеть выбор метода последующей генетической диагностики у эмбриона.

Последующее внедрение искусственного интеллекта в медицинскую практику, возможно, повысит точность диагностики в ПГТ.

Это увеличит достоверность полученных результатов, раскроет механизмы происхождения генетического дисбаланса, что в конечном итоге улучшит качество медико-генетического консультирования семей с высоким риском рождения больного ребенка.

**Благодарности:** Авторы благодарят учениц 9-го класса ГБОУ «Школа № 1358», ГБОУ «Школа № 1514» г. Москвы К.В. Науменко и М.А. Фролову за помощь в переводе зарубежных публикаций для статьи.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Лебедев И.Н. Современные геномные технологии в решении задач клинической цитогенетики. В кн.: Масленников А.Б., Бравве Ю.И., Пузырев В.П. и др., ред. Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Новосибирск: 2014; 20: 3–13. [Lebedev I.N. Modern genomic technologies in solving problems of clinical cytogenetics. In: Maslennikov A.B., Bravve Yu.I., Puzyrev V.P.

- et al., eds. Molecular and biological technologies in medical practice. Novosibirsk: 2014; 20: 3–13. (in Russian)]
2. McKinlay Gardner R.J., Amor D.J. Gardner and Sutherland's Chromosome abnormalities and genetic counseling. Oxford University Press; 2018: 340–8, 634. DOI: 10.1093/med/9780199329007.001.0001
3. Кузнецова Т.В., Шилова Н.В., Творогова М.Г. и др. Практические рекомендации по обеспечению качества и надежности цитогенетики.

- метических исследований. Медицинская генетика. 2019; 18(5): 3–27. [Kuznetsova T.V., Shilova N.V., Tvorogova M.G. et al. Practical recommendations to ensure quality and safety of cytogenetic research. *Medical Genetics*. 2019; 18(5): 3–27. (in Russian)]. DOI: 10.25557/2073-7998.2019.05.3-27
4. Jacobs P.A., Melville M., Ratcliffe S. et al. A cytogenetic survey of 11,680 newborn infants. *Ann. Hum. Genet.* 1974; 37(4): 359–76. DOI: 10.1111/J.1469-1809.1974.TB01843.X
  5. Nielsen J., Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum. Genet.* 1991; 87(1): 81–3. DOI: 10.1007/BF01213097
  6. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека: научно-практические аспекты. СПб.: Издательство Н-Л; 2006. 640 с. [Baranov V.S., Kuznetsova T.V. *Cytogenetics of human embryonic development: scientific and practical aspects*. SPb.: Publishing house N-L; 2006. 640 p. (in Russian)]
  7. Ni T., Wu Q., Zhu Y. et al. Comprehensive analysis of the associations between previous pregnancy failures and blastocyst aneuploidy as well as pregnancy outcomes after PGT-A. *J. Assisted Reprod. Gen.* 2020; 37(3): 579–88. DOI: 10.1007/S10815-020-01722-9
  8. Рубцов Н.Б. Методы работы с хромосомами млекопитающих: учебное пособие. Новосибирск: Новосибирский государственный университет; 2006. 147 с. [Rubtsov N.B. *Methods of working with mammalian chromosomes: textbook*. Novosibirsk: Novosibirsk State University; 2006. 147 p. (in Russian)]
  9. McGowan-Jordan J., Simons A., Schmid M. *Basel ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature*. New York: Karger; 2016. Reprint of *Cytogenetic and Genome Research*. 2016; 149(1–2). 140 p.
  10. Munné S., Kaplan B., Frattarelli J. et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy versus morphology as selection criteria for single frozen-thawed embryo transfer in good-prognosis patients: a multicenter randomized clinical trial. *Fertil. Steril.* 2019; 112(6): 1071–1079.e7. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.07.1346
  11. Friedenthal J., Maxwell S.M., Munné S. et al. Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles. *Fertil. Steril.* 2018; 109(4): 627–63. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.12.017 

Поступила / Received: 25.09.2020

Принята к публикации / Accepted: 02.12.2020