



Анализ конкордантности результатов преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии методом Next Generation Sequencing на платформе Illumina в клетках разных областей трофобласта

Ж.И. Глинкина¹✉, А.Ф. Сайфитдинова^{2,3}, О.А. Павлова^{2,4}, О.А. Леонтьева², А.Н. Панина², Н.К. Бичева², И.В. Борозняк¹

¹ ООО «Хайтек Генетикс»; Россия, г. Москва

² АО «Международный центр репродуктивной медицины»; Россия, г. Санкт-Петербург

³ ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена»; Россия, г. Санкт-Петербург

⁴ ООО «Бигль»; Россия, г. Санкт-Петербург

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: выполнить исследование клеток трофобласта (ТЭ) из разных областей эмбриона методом высокопроизводительного полногеномного секвенирования (Next Generation Sequencing, NGS) на платформе Illumina и сравнить данные для выявления степени дискордантности разных образцов одного эмбриона.

Дизайн: сравнительное исследование.

Материалы и методы. Для исследования использованы эмбрионы человека на ранних этапах развития, полученные в результате искусственного оплодотворения гамет здоровых доноров с нормальным кариотипом в рамках программы экстракорпорального оплодотворения. Для исследования были выбраны 14 эмбрионов человека, полученных в результате оплодотворения ооцитов от 10 доноров в возрасте от 20 до 32 лет донорской спермой 9 доноров из банка спермы ООО «МЦРМ». Два эмбриона деградировали в процессе разморозки. У 12 эмбрионов выполнена повторная биопсия клеток ТЭ в двух независимых участках: одна биопсия ТЭ, прилежащей к клеткам внутренней клеточной массы (ВКМ), и вторая биопсия ТЭ с противоположного от эмбриобласта полюса бластоцисты.

Результаты. Сравнительное исследование молекулярного кариотипа клеток ТЭ, полученных из разных участков бластоцисты 12 эмбрионов, 36 образцов (по 3 от каждого), показало частичное расхождение только в одном наблюдении. При первичном исследовании у эмбриона молекулярный кариотип был представлен трисомией хромосомы 16: Seq(16)x3,(XY)x1. При вторичном выявлена дополнительно делеция в виде мозаицизма участка хромосомы 7 в клетках, прилежащих к ВКМ эмбриона: Seq(16)x3,(7q21.3 -> 7q36.3)x[0.5]. Все остальные результаты показали полную конкордантность вне зависимости от исследуемого участка ТЭ, а также лаборатории, в которой выполнено секвенирование.

Заключение. Можно сделать вывод, что преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии эмбрионов 5-го дня развития на основе методов высокопроизводительного полногеномного секвенирования на платформе Illumina позволяет получить надежные данные о хромосомных аномалиях и может быть успешно применено для выявления анеуплоидий у доимплантационных эмбрионов.

Ключевые слова: преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии, Next Generation Sequencing, экстракорпоральное оплодотворение, анеуплоидия, мозаицизм эмбрионов, хромосомная патология.

Вклад авторов: Глинкина Ж.И. — разработка дизайна исследования, определение целей и задач, секвенирование и анализ результатов образцов, написание рукописи, подготовка к печати, утверждение рукописи для публикации; Сайфитдинова А.Ф. — разработка дизайна исследования, подбор материала, полногеномная амплификация ДНК образцов, написание рукописи; Павлова О.А. — работа с документацией для проведения исследования, полногеномная амплификация ДНК образцов; Леонтьева О.А. — работа с гаметами и эмбрионами: криоконсервация и культивирование, биопсия эмбрионов; Панина А.Н. — работа с документацией для проведения исследования, криоконсервация и культивирование эмбрионов, биопсия эмбрионов; Бичева Н.К. — организация исследования, подготовка документации, культивирование ооцитов; Борозняк И.В. — работа с документацией для проведения исследования, подготовка библиотек для последующего секвенирования.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

Для цитирования: Глинкина Ж.И., Сайфитдинова А.Ф., Павлова О.А., Леонтьева О.А., Панина А.Н., Бичева Н.К., Борозняк И.В. Анализ конкордантности результатов преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии методом Next Generation Sequencing на платформе Illumina в клетках разных областей трофобласта. Доктор.Ру. 2022; 21(5): 18–24. DOI: 10.31550/1727-2378-2022-21-5-18-24



Analysis of Concordance of Pre-implantation Aneuploidy Genetic Testing Results Obtained Using Next Generation Sequencing on Illumina Platform in Cells of Various Parts of Trophoblast

Zh.I. Glinkina¹✉, A.F. Sayfitdinova^{2,3}, O.A. Pavlova^{2,4}, O.A. Leontyeva², A.N. Panina², N.K. Bichevaya², I.V. Boroznyak¹

¹ Hi-Tech Genetics; 11/1 Leninskiy Prospect, Moscow, Russian Federation 119532

² International Centre for Reproductive Medicine JSC; 53/1 Komendantskiy Prosp., St. Petersburg, Russian Federation 197350

³ The Herzen State Pedagogical University of Russia; 48 Naberezhnaya Moyki, St. Petersburg, Russian Federation 191186

⁴ Beagle LLC; 152/1 Bukharestskaya Str., St. Petersburg, Russian Federation 192289

✉ Глинкина Жанна Ивановна / Glinkina, Zh.I. — E-mail: janna435@yandex.ru

ABSTRACT

Study Objective: To study trophoblast (TB) cells taken from various sections of the embryo using Next Generation Sequencing (NGS) on Illumina platform, and to compare data in order to identify the degree of discordance between various samples from one embryo.

Study Design: Comparative study.

Materials and Methods. For the study, we used human embryos at early development stages, which originated from artificial insemination of germ cells taken from healthy donors with normal karyotype within the scope of the in vitro fertilisation program. We selected 14 human embryos originating from insemination of oocytes of 10 donors aged 20 to 32 years old with sperm taken from 9 donors from the semen bank of the International Centre for Reproductive Medicine. Two embryos underwent degradation during defrosting. For 12 embryos, we performed a repeated TB cells biopsy from two independent sections: one biopsy from TB adjacent to inner cell mass (ICM) cells and the other TB biopsy from blastocyte pole opposite to the embryoblast.

Study Results. A comparison of molecular karyotype of TB cells taken from various sections of blastocyte in 12 embryos, 36 samples (3 sample for each embryo), demonstrated partial discordance only in one observation. In initial study, molecular karyotype of an embryo showed trisomy 16 syndrome: $\text{Seq}(16)\times 3,(\text{XY})\times 1$. In the follow-up study, we found an additional deletion in the form of mosaicism in chromosome 7 section adjacent to ICM of the embryo: $\text{Seq}(16)\times 3, (7q21.3 \rightarrow 7q36.3)\times [0.5]$. All other results demonstrated complete concordance irrespective of a TB section in question or a laboratory where sequencing was performed.

Conclusion. It may be concluded that pre-implantation aneuploidy genetic testing of 5-day-old embryos using Next Generation Sequencing on Illumina platform allows obtaining reliable information on chromosomal abnormalities and can be successfully used to identify aneuploidy in pre-implantation embryos.

Keywords: pre-implantation aneuploidy genetic testing, Next Generation Sequencing, in vitro fertilisation, aneuploidy, embryo mosaicism, chromosomal pathology.

Contributions: Glinkina, Zh.I. — study design, definition of objectives and tasks, sequencing and analysis of results, text of the article, preparation for publication, approval of the manuscript for publication; Sayfitdinova, A.F. — study design, material collection, genome-wide amplification of DNA samples, text of the article; Pavlova, O.A. — document management for the study, genome-wide amplification of DNA samples; Leontyeva, O.A. — germ cells and embryos handling, cryoconservation and cultivation, embryo biopsy; Panina, A.N. — document management for the study, cryoconservation and cultivation, embryo biopsy; Bichevaya, N.K. — organisation of the study, preparation of documents, oocyte cultivation; Boroznyak, I.V. — document management for the study, preparation of libraries for subsequent sequencing.

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

For citation: Glinkina Zh.I., Sayfitdinova A.F., Pavlova O.A., Leontyeva O.A., Panina A.N., Bichevaya N.K., Boroznyak I.V. Analysis of Concordance of Pre-implantation Aneuploidy Genetic Testing Results Obtained Using Next Generation Sequencing on Illumina Platform in Cells of Various Parts of Trophoblast. Doctor.Ru. 2022; 21(5): 18–24. (in Russian). DOI: 10.31550/1727-2378-2022-21-5-18-24

ВВЕДЕНИЕ

Преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) прочно заняло свое место среди ранних профилактических мероприятий, предупреждающих рождение больного ребенка. Применение новых технологий открывает широкие возможности для обнаружения генетических нарушений. Однако при внедрении новых диагностических методов возникли проблемы, связанные с возможностью получения различных результатов при исследовании разных клеток одного и того же эмбриона.

Известно, что у новорожденных в среднем около 10% всех генетических нарушений развития связаны с трисомиями и моносомиями по различным хромосомам, а с увеличением возраста матери эта цифра возрастает до 50% [1]. До недавнего времени было принято считать, что численные хромосомные аномалии возникают главным образом в результате аномальной сегрегации хромосом в мейозе, преимущественно в оогенезе [2].

На первых этапах развития ВРТ на основе ЭКО главным критерием оценки качества эмбрионов для переноса в полость матки была их морфология. Накопленный опыт ВРТ показал, что, к сожалению, морфологические характеристики эмбрионов не могут отражать их генетический статус [3]. В связи с этим требовались новые подходы к профилактике рождения больного ребенка в рамках ВРТ.

Необходимость повышения эффективности программ ВРТ способствовала развитию методов ПГТ, которые сейчас входят в комплекс исследований, объединяющих различные технологические подходы для проведения ПГТ на наличие анеуплоидий (ПГТ-А), анализа на моногенные заболевания и структурные перестройки [4]. Уже с 1990-х годов исследователи рекомендуют для повышения результативности всей процедуры проводить селекцию и перенос зуплоидных эмбрионов в рамках программы ЭКО.

В настоящее время ПГТ-А — наиболее часто применяемая технология, направленная на увеличение эффективности лечения бесплодия с помощью ВРТ. Это связано с тем, что численные хромосомные аномалии служат причиной остановки развития эмбрионов, приводят к спонтанным абортam и рождению детей с пороками развития. Показано, что на ранних стадиях развития у человека до 80% нарушений вызваны хромосомными аномалиями [5].

За более чем 20-летний период исследований накопилось множество данных, подтверждающих высокий уровень анеуплоидий у ранних эмбрионов человека, причем оказалось, что, помимо нарушений сегрегации хромосом во время мейоза, численные хромосомные аномалии могут быть следствием нарушения расхождения хромосом в ходе первых делений дробления эмбриона, которые приводят к возникновению в составе одного эмбриона клонов клеток с различным хромосомным набором [6]. Это явление получило название эмбрионального мозаицизма. Очевидно, что мозаицизм может исказить результаты ПГТ-А.

Для повышения эффективности процедур ВРТ в целом необходимы дополнительные исследования природы мозаицизма и его значимости для разных стадий эмбрионального и пренатального развития человека. Оценивая мозаицизм доимплантационных эмбрионов на стадии бластоцисты, следует помнить, что уровень мозаицизма в клетках трофэктодермы (ТЭ) не обязательно тождественен уровню мозаицизма в клетках внутренней клеточной массы (ВКМ). Опубликованных данных, позволяющих сравнить уровни мозаицизма клеток ТЭ и клеток ВКМ, немного, и они противоречивы.

Гораздо больше достоверной информации о мозаицизме получено на основе результатов пренатальной диагностики. Показано, что около 1% всех прогрессирующих

беременностей первого триместра имеют в хорионе мозаицизм, но при этом не более 10% плодов с мозаичным хорионом являются мозаиками, то есть присутствие аномального клеточного клона в тканях плода при его наличии в хорионе (истинный, или генерализованный, мозаицизм) составляет около 0,1% от всех случаев развивающихся беременностей [7].

Воздействие плацентарного (истинного и псевдо-) мозаицизма на пренатальное и постнатальное развитие имеет широкий диапазон — от отсутствия эффекта (недетектируемое влияние) до гибели плода на разных сроках беременности или рождения ребенка с генетическими нарушениями.

Влияние мозаицизма на развитие человека зависит от его типа, хромосомы или хромосомных участков (размера), вовлеченных в мозаицизм, типа патологии (моносомия, трисомия, мозаичная форма структурной хромосомной аномалии), локализации гетероплоидных клеток, уровня мозаицизма (%). Предположительно, аналогичное влияние мозаицизма должно наблюдаться и у доимплантационных эмбрионов. Так, локализация летальных геномных изменений в ВКМ (истинный мозаицизм) может привести к нарушению формирования эмбриональных структур и к гибели эмбриона, а локализация их в ТЭ — к нарушению имплантации или, в дальнейшем, к нарушению формирования хориона. Влияние сублетальных геномных aberrаций будет менее выражено, но может вызывать гибель эмбриона на постимплантационных стадиях развития или рождение ребенка с врожденной генетической патологией.

Феномен мозаицизма доимплантационных эмбрионов человека, выявляемый почти в каждом цикле ЭКО с ПГТ-А, ставит перед специалистами неизбежный вопрос о том, насколько точно определены наличие и уровень мозаицизма. Многочисленные опубликованные данные показывают, что детектируемый уровень мозаицизма у доимплантационных эмбрионов меняется в зависимости от стадии дробления и от используемого метода исследования.

Первоначально используемый метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) позволял определить мозаицизм лишь по половым хромосомам и 10 ауто索мам у эмбрионов третьего дня развития и только в случаях биопсии двух и более бластомеров. Таким образом, нельзя было получить информацию о мозаицизме неисследованных хромосом и определить истинный уровень (%) мозаицизма по исследованным хромосомам.

Начиная с 2012 года благодаря использованию метода микроматричного анализа (array CGH) появилась возможность одновременного исследования всех хромосом набора в нескольких клетках ТЭ. Однако этот метод позволяет выявлять мозаицизм, если доля анеуплоидных клеток в образце ТЭ более 40%, следовательно, достоверно определить наличие мозаицизма и его уровень с помощью этого методического подхода не всегда возможно [8, 9].

Развитие методов Next Generation Sequencing (NGS) в сочетании с современными технологиями полногеномной амплификации ДНК из единичных клеток позволило начать их внедрение в практику ПГТ. Благодаря высокой чувствительности метод на основе высокопроизводительного секвенирования позволяет уверенно выявлять мозаицизм в образце ДНК из ТЭ с точностью до 20% (одна клетка с анеуплоидией из пяти).

Цель исследования: выполнить исследование клеток ТЭ из разных областей эмбриона методом NGS на платформе Illumina и сравнить данные для выявления степени дискордантности разных образцов одного эмбриона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования использованы эмбрионы человека на ранних этапах развития, полученные в результате искусственного оплодотворения гамет здоровых доноров в рамках программы ЭКО. Обязательным условием проведения исследования стало наличие индивидуального добровольного согласия доноров на основе этических принципов исследования в соответствии с Хельсинкской декларацией в редакции 2013 года.

Отбор доноров гамет соответствовал требованиям, перечисленным в Приказе Минздрава РФ № 107н от 30 августа 2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению», с некоторыми дополнительными условиями, определенными на основе нашего опыта работы [10]. Все доноры прошли обязательное кариотипирование и генетическое консультирование до вступления в программу донации в АО «МЦРМ». Оплодотворение проводили в лабораторных условиях по опубликованному ранее протоколу [4].

Для исследования были выбраны 14 эмбрионов человека, полученных в результате оплодотворения ооцитов от 10 доноров в возрасте от 20 до 32 лет донорской спермой 9 доноров из банка спермы АО «МЦРМ». Через 16–18 часов после оплодотворения производили визуальную качественную оценку пронуклеусов и полярных телец, после чего эмбрионы культивировали 5–6 дней на средах COOK до формирования бластоцист.

Морфологическую оценку бластоцист осуществляли, согласно классификации Гарднера [11, 12]. У бластоцист отличного и хорошего качества выполнены биопсия клеток ТЭ с использованием лазера и последующая их криоконсервация методом витрификации на средах Kitazato. Полногеномную амплификацию проводили набором PicoPLEX WGA Kit (Rubicon Genomics), количественную оценку ДНК (WGA продукта) — с помощью флуориметра Quantus™ Fluorometer (Promega) и набора реактивов QuantiFluor® dsDNA System, приготовление библиотек — набором VeriSeq PGS kit (Illumina). Качество геномных библиотек оценивали на приборе TapeStation 4200 (Agilent). Секвенирование (NGS) выполняли на аппарате Illumina MiSeq, анализ на численные хромосомные аномалии — с применением программного обеспечения BlueFuse Multi v4.3 (Illumina). Эффективное разрешение метода — 20 м. п. н.

Секвенирование выполнено на базе сектора клинко-генетических исследований СПб ГБУЗ «Городская больница № 40».

По результатам ПГТ-А у всех исследованных бластоцист установлено наличие анеуплоидии по одной из хромосом. После получения заключения клинического генетика анеуплоидные эмбрионы (непригодные для переноса и развития здорового плода) были разморожены и культивировались до 6 суток развития. Два эмбриона деградировали в процессе разморозки. У 12 эмбрионов произведена повторная биопсия клеток ТЭ в двух независимых участках: одна биопсия ТЭ, прилежащей к клеткам ВКМ, и вторая биопсия ТЭ с противоположного от эмбриобласта полюса бластоцисты.

Последующее тестирование образцов проводили на базе ЦГИ «Хайтек Генетикс». Полногеномную амплификацию выполняли, как описано выше. Приготовление библиотек осуществляли набором VeriSeq PGS, секвенирование объединенной библиотеки — на приборе MiSeq компании Illumina, анализ на численные хромосомные аномалии — с использованием программного обеспечения BlueFuse Multi v4.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интересен факт, что оба эмбриона, оказавшиеся нежизнеспособными после криоконсервации, имели моносомии разных хромосом. У 12 эмбрионов, подвергшихся дальнейшему исследованию (24 образца), получены результаты секвенирования, отвечающие всем необходимым требованиям для выдачи результата анализа (табл.).

Девять из 12 повторно успешно проанализированных эмбрионов имели трисомии по различным хромосомам. Два эмбриона имели моносомии хромосом 10 и 21 (рис. 1 А–С). У одного эмбриона выявлена тетрасомия хромосомы 8 и при первичном, и при вторичном исследовании (рис. 1 D–F). В одном образце, где первично была установлена трисомия хромосомы 16, при повторной диагностике найдена дополнительно делеция района длинного плеча хромосомы 7 в мозаичной форме, не обнаруженная в других участках ТЭ этого эмбриона (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Профилактика генетических заболеваний, отношение к здоровью населения служат одними из основных показателей развития современного общества, его социальной политики. Во всем мире ранней профилактике рождения больных

детей уделяется особое внимание. Это связано с тем, что репродуктивное поведение человека сильно изменилось за последние годы и женщины стали рожать в позднем репродуктивном возрасте, что повышает риск рождения ребенка с генетическими отклонениями. Применяя новые технологии в профилактике, врачи должны быть уверены в точности проводимых мероприятий, особенно в рамках программ ЭКО, цель которых — рождение здоровых детей.

Однако на сегодняшний день не существует ни одного метода профилактической диагностики, который давал бы стопроцентную гарантию рождения здорового младенца. Это может быть связано с возможностями и ограничениями применяемого метода, а также с особенностью исследуемого материала. В современном мире чувствительность и специфичность технологий можно повышать, а повлиять на биологию раннего развития организма пока не представляется возможным. Проведенное исследование демонстрирует высокую точность метода, однако не может точно указывать на наличие или отсутствие мозаицизма в эмбрионе.

Для точного понимания причин возникновения мозаицизма, его уровня и исключения влияния на его возникновение нарушений репродуктивной функции необходимо детально исследовать показатели выявляемого мозаицизма

Таблица / Table

Результаты секвенирования исследуемых образцов
Sequencing results for test samples

№	№ эмбриона	Результат первого преимплантационного генетического тестирования	Повторная биопсия. Код образца	Результат повторного преимплантационного генетического тестирования
1	1	Seq(9)x3	210304 1d	Seq(9)x3
2	1	–	210304 1p	Seq(9)x3
3	2	Seq(16)x3	210304 2d	Seq(16)x3
4	2	–	210304 2p	Seq(16)x3
5	3	Seq(19)x3	210304 3d	Seq(19)x3
6	3	–	210304 3p	Seq(19)x3
7	4	Seq(8)x4	210304 4d	Seq(8)x4
8	4	–	210304 4p	Seq(8)x4
9	5	Seq(16)x3	210305 5d	Seq(16)x3
10	5	–	210305 5p	Seq(16)x3, (7q21.3 -> 7q36.3)x[0.5]
11	6	Seq(19)x3	210310 6d	Seq(19)x3
12	6	–	210310 6p	Seq(19)x3
13	7	Seq(10)x1	210310 7d	Seq(10)x1
14	7	–	210310 7p	Seq(10)x1
15	8	Seq(16)x3	210316 8d	Seq(16)x3
16	8	–	210316 8p	Seq(16)x3
17	9	Seq(21)x1	210316 9d	Seq(21)x1
18	9	–	210316 9p	Seq(21)x1
19	10	Seq(6)x3	210316 10d	Seq(6)x3
20	10	–	210316 10p	Seq(6)x3
21	11	Seq(22)x3	210324 11d	Seq(22)x3
22	11	–	210324 11p	Seq(22)x3
23	13	Seq(16)x3	210324 13d	Seq(16)x3
24	13	–	210324 13p	Seq(16)x3

Рис. 1. Примеры анализов результатов секвенирования клеток ТЭ методом NGS на платформе Illumina в программе BlueFluse Multi. А — профиль секвенирования образца ТЭ при первичном исследовании эмбриона № 7. Результат анализа: Seq(10)x1,(X)x2. В — профиль секвенирования образца участка рядом с ВКМ эмбриона № 7 при повторном исследовании. Результат анализа: Seq(10)x1,(X)x2. С — профиль секвенирования образца участка противоположной стороны от ВКМ при повторном исследовании эмбриона № 7. Результат анализа: Seq(10)x1,(X)x2. D — профиль секвенирования образца ТЭ при первичном исследовании эмбриона № 4. Результат анализа: Seq(8)x4,(XY)x1. E — профиль секвенирования образца участка рядом с ВКМ при повторном исследовании эмбриона № 4. Результат анализа: Seq(8)x4,(XY)x1. F — профиль секвенирования образца участка противоположной стороны от ВКМ при повторном исследовании эмбриона № 4. Результат анализа: Seq(8)x4,(XY)x1.
 Примечание. Здесь и в рисунке 2: ВКМ — внутренняя клеточная масса, ТЭ — трофобласт, NGS — Next Generation Sequencing

Fig. 1. Examples of analyses of TB cell sequencing results using Illumina NGS in BlueFluse Multi software. A: sequencing profile of TB sample in initial examination of embryo No. 7. Analysis results: Seq(10)x1,(X)x2. B: sequencing profile of a sample taken from the area adjacent to ICM of embryo No. 7 in repeated examination. Analysis results: Seq(10)x1,(X)x2. C: sequencing profile of a sample taken from the area opposite to ICM in repeated examination of embryo No. 7. Analysis results: Seq(10)x1,(X)x2. D: sequencing profile of TB sample in initial examination of embryo No. 4. Analysis results: Seq(8)x4,(XY)x1. E: sequencing profile of a sample taken from the area adjacent to ICM in repeated examination of embryo No. 4. Analysis results: Seq(8)x4,(XY)x1. F: sequencing profile of a sample taken from the area opposite to ICM in repeated examination of embryo No. 4. Analysis results: Seq(8)x4,(XY)x1.
 Note. Legend for Fig. 1 and Fig. 2: ICM = internal cell mass; TB = trophoblast; NGS = Next Generation Sequencing

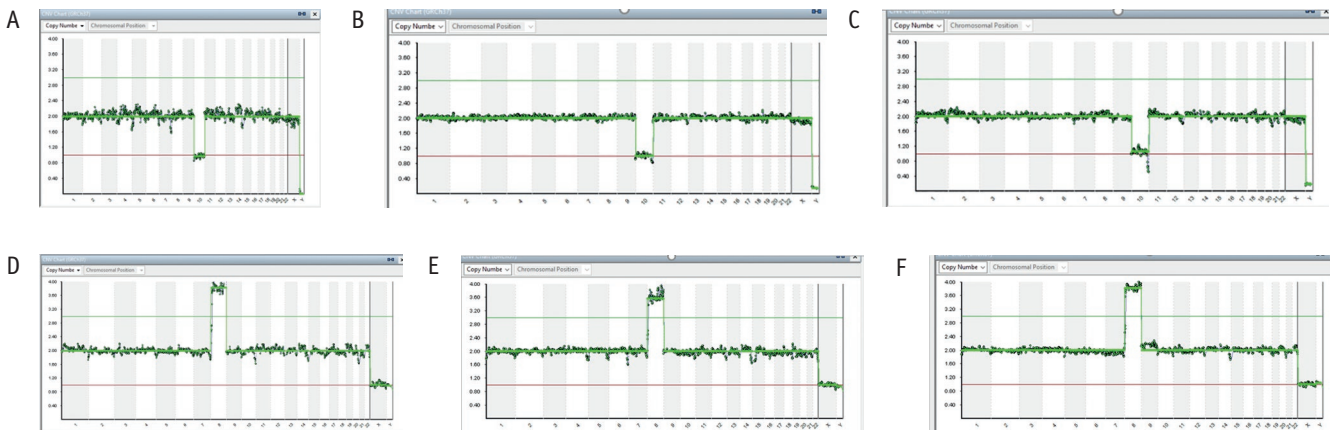
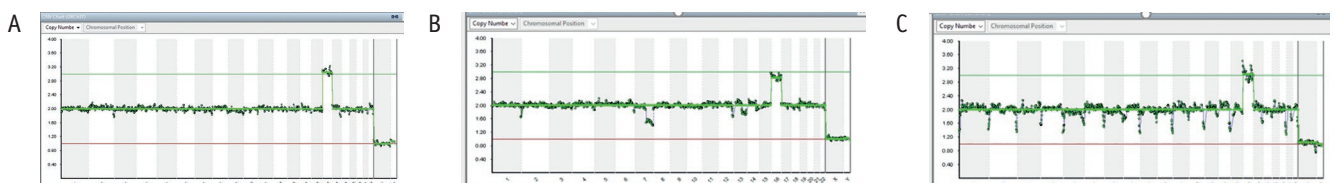


Рис. 2. Анализ результатов секвенирования клеток ТЭ методом NGS на платформе Illumina в программе BlueFluse Multi. А — профиль секвенирования образца при первичном исследовании эмбриона № 5. Результат анализа: Seq(16)x3,(XY)x1. В — профиль секвенирования образца участка рядом с ВКМ при повторном исследовании эмбриона № 5. Результат анализа: Seq(16)x3,(7q21.3 -> 7q36.3)x[0.5]. С — профиль секвенирования образца участка противоположной стороны от ВКМ при повторном исследовании эмбриона № 5. Результат анализа: Seq(16)x3,(XY)x1
 Fig. 2. Analyses of TB cell sequencing results using Illumina NGS in BlueFluse Multi software. A: sequencing profile of a sample in initial examination of embryo No. 5. Analysis results: Seq(16)x3,(XY)x1. B: sequencing profile of a sample taken from the area adjacent to ICM in repeated examination of embryo No. 5. Analysis results: Seq(16)x3,(7q21.3 -> 7q36.3)x[0.5]. C: sequencing profile of a sample taken from the area opposite to ICM in repeated examination of embryo No. 5. Analysis results: Seq(16)x3,(XY)x1



эмбрионов, полученных в программах ВРТ. Анализ уровня мозаицизма у доимплантационных донорских blastocyst на основе данных ПГТ-А методом NGS, выполненный в девяти различных центрах ВРТ, показал, что он может

колебаться от 17% до 47% [13]. Это является серьезным вызовом для специалистов, работающих в области ПГТ, и приводит к появлению сомнений в целесообразности таких исследований.

В основе указанных публикаций лежит утверждение о том, что на стадии бластоцисты наличие высокого уровня хромосомного мозаицизма может быть нормальным явлением и клетки ТЭ в разных частях эмбриона с высокой частотой (если не всегда) будут иметь различия в наборе хромосом [14]. В то же время на результаты выполненного анализа могли оказать влияние различные факторы, включая деградацию ДНК под влиянием «человеческого фактора», а верификация данных в независимой лаборатории не была включена в протокол исследования.

Теоретические оценки указывают на то, что с учетом числа клеток в биоптате доля выявляемого мозаицизма не должна достигать таких высоких показателей. Эти данные также не соответствовали результатам исследований молекулярного кариотипа клеток из разных участков эмбрионов, выполненных при повторных биопсиях одних и тех же эмбрионов [15].

Анализ результатов молекулярного кариотипа различных участков эмбрионов с выявленным ранее мозаицизмом, по данным проведенного ПГТ-А, показал некоторые отличия в клетках из различных участков ТЭ и ТЭ с ВКМ [16]. Однако в этих исследованиях не выявлены значимые различия в молекулярном кариотипе исследованных образцов, что свидетельствует о существовании определенных биологических закономерностей. В то же время до сих пор до конца не изучен механизм возникновения мозаицизма, а также характер его влияния на дальнейшее развитие эмбриона человека. Вышесказанное указывает на необходимость проведения дальнейшего исследования доимплантационных

эмбрионов современными генетическими методами с участием независимых лабораторий для повышения уровня достоверности результатов.

Наше сравнительное исследование молекулярного кариотипа клеток ТЭ, полученных из разных участков 12 эмбрионов, 36 образцов (по 3 от каждого), показало частичное расхождение только в одном наблюдении. При первичном исследовании у эмбриона молекулярный кариотип был представлен трисомией хромосомы 16: Seq(16)x3,(XY)x1. При вторичном выявлена дополнительно делеция в виде мозаицизма участка хромосомы 7 в клетках, прилежащих к ВКМ эмбриона: Seq(16)x3,(7q21.3 -> 7q36.3)x[0.5]. Все остальные результаты показали полную конкордантность вне зависимости от исследуемого участка ТЭ, а также лаборатории, в которой проведено исследование.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Можно сделать вывод, что преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии эмбрионов 5-го дня развития на основе методов высокопроизводительного полногеномного секвенирования на платформе Illumina позволяет получить надежные данные о хромосомных аномалиях и может быть успешно применено для выявления анеуплоидий у доимплантационных эмбрионов. Но необходимо изучать процессы доимплантационного развития эмбрионов, приводящие к появлению мозаицизма, и учитывать их при разработке новых методов повышения точности профилактических мероприятий.


Благодарности. Авторы выражают благодарность президенту Российской ассоциации репродукции человека, проф., д. м. н. Владиславу Станиславовичу Корсаку за активную поддержку развития самых передовых методов преимплантационных генетических исследований в России. Мы также благодарны к. б. н. Олегу Сергеевичу Глотову и Ирине Васильевне Поляковой за предоставление первичных данных преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии, выполненного на базе сектора клинко-генетических исследований СПб ГБУЗ «Городская больница № 40» для проведения сравнительного анализа с результатами исследований материала повторно выполненных биопсий.

Авторы статьи благодарят компанию «Альбиоген» и ее генерального директора Фролова Александра Сергеевича за предоставленные наборы VeriSeq PGS компании Illumina для выполнения данной работы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Nagaoka S.I., Hassold T.J., Hunt P.A. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an ageold problem. *Nat. Rev. Genet.* 2012; 13(7): 493–504. DOI: 10.1038/nrg3245
- Hassold T., Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* 2001; 2(4): 280–91. DOI: 10.1038/35066065
- Minasi M.G., Colasante A., Riccio T., Ruberti A. et al. Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study. *Hum. Reprod.* 2016; 31(10): 2245–54. DOI: 10.1093/humrep/dew183
- Корсаков В.С., Балахоннов А.В., Бичевая Н.К., Кузнецова Р.А. и др. Руководство по клинической эмбриологии. М.: СИМК; 2019. 224 с. [Korsakov V.S., Balakhonov A.V., Bichevaya N.K., Kuznetsova R.A. et al. A guide in clinical embryology. M.: SIMK; 2019. 224 p. (in Russian)]
- Gardner R.J.M., Amor D.J. Gardner and Sutherland's chromosome abnormalities and genetic counseling. New York: Oxford University Press; 2018. 784 p.
- Daughtry B.L., Chavez S.L. Chromosomal instability in mammalian pre-implantation embryos: potential causes, detection methods, and clinical consequences. *Cell Tissue Res.* 2016; 363(1): 201–25. DOI: 10.1007/s00441-015-2305-6
- Grati F.R. Chromosomal mosaicism in human fetoplacental development: implications for prenatal diagnosis. *J. Clin. Med.* 2014; 3(3): 809–37. DOI: 10.3390/jcm3030809
- Munné S., Weier H.U. Simultaneous enumeration of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y in interphase cells for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Cytogenet. Cell Genet.* 1996; 75(4): 263–70. DOI: 10.1159/000134497
- Verlinsky Y., Kuliev A. Preimplantation diagnosis of common aneuploidies in infertile couples of advanced maternal age. *Hum. Reprod.* 1996; 11(10): 2076–7. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019050.
- Бичевая Н.К., Леонтьева О.А., Сайфитдинова А.Ф., Пастухова Ю.Р. и др. Использование донорских гамет и эмбрионов для лечения бесплодия. *Акушерство и гинекология.* 2020; 11: 190–6. [Bichevaya N.K., Leontyeva O.A., Saifitdinova A.F., Pastukhova Yu.R. et al. Use of donor gametes and embryos for the treatment of infertility. *Obstetrics and Gynecology.* 2020; 11: 190–6. (in Russian)]. DOI: 10.18565/aig.2020.11.190-196
- Gardner D.K., Schoolcraft W.B. In vitro culture of human blastocysts. In: Jansen R., Mortimer D., eds. *Toward reproductive certainty: fertility and genetics beyond.* London: Parthenon Publishing; 1999: 378–88.
- Gardner D.K., Schoolcraft W.B. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 1999; 11(3): 307–11. DOI: 10.1097/00001703-199906000-00013
- Sachdev N.M., Ribustello L., Liu E., McCulloh D.H. et al. The rate of mosaic embryos from donor egg as detected by next generation sequencing (NGS) varies by IVF laboratory. *Fertil. Steril.* 2016; 106(3 suppl.): e156–7. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.463
- Gleicher N., Patrizio P., Brivanlou A. Preimplantation genetic testing for aneuploidy — a castle built on sand. *Trends in molecular medicine. Opinion Special Issue: Reproductive and Sexual Health.* 2021; 27(8): 731–42. DOI: 10.1016/j.molmed.2020.11.009

15. Taylor T.H., Griffin D.K., Katz S.L., Crain J.L. et al. *Technique to 'map' chromosomal mosaicism at the blastocyst stage. Cytogenet. Genome Res.* 2016; 149(4): 262–6. DOI: 10.1159/000449051

16. Saifitdinova A.F., Glotov O.S., Polyakova I.V., Bichevaya N.K. *Mosaicism in preimplantation human embryos. Integrative Physiology.* 2020; 1(3): 225–30. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-225-230 

Поступила / Received: 20.01.2022

Принята к публикации / Accepted: 02.02.2022

Об авторах / About the authors

Глинкина Жанна Ивановна / Glinkina, Zh.I. — д. б. н., генеральный директор ООО «Хайтек Генетикс». 119532, Россия, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 111, кор. 1. eLIBRARY.RU SPIN: 3567-5703. <http://orcid.org/0000-0001-5879-418X>. E-mail: janna435@yandex.ru

Сайфитдинова Алсу Фаритовна / Sayfitdinova, A.F. — д. б. н., заместитель заведующего лабораторией ВРТ АО «МЦРМ»; доцент кафедры анатомии и физиологии человека и животных ФГБОУ ВО РГПУ им. А.Л. Герцена. 191186, Россия, г. Санкт-Петербург, набережная Мойки, д. 48. E-mail: saifitdinova@raail.ru

Павлова Ольга Андреевна / Pavlova, O.A. — к. б. н., биолог лаборатории ВРТ АО «МЦРМ»; специалист лаборатории ООО «Бигль». 192289, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Бухарестская, д. 152/1. E-mail: beagle07@bk.ru

Леонтьева Ольга Анатольевна / Leontyeva, O.A. — эмбриолог лаборатории ВРТ АО «МЦРМ». 197350, Россия, г. Санкт-Петербург, Комендантский пр-т, д. 53/1. E-mail: olga_leont@mail.ru

Панина Алиса Николаевна / Panina, A.N. — эмбриолог лаборатории ВРТ АО «МЦРМ». 197350, Россия, г. Санкт-Петербург, Комендантский пр-т, д. 53/1. E-mail: alisa@panina.net

Бичевая Наталья Константиновна / Bichevaya, N.K. — к. б. н., заведующая лабораторией ВРТ АО «МЦРМ». 197350, Россия, г. Санкт-Петербург, Комендантский пр-т, д. 53/1. E-mail: bichevaya@mcrm.ru

Борозняк Иван Владимирович / Boroznyak, I.V. — заместитель генерального директора по развитию ООО «Хайтек Генетикс». 119532, Россия, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 111, кор. 1. E-mail: ivan.boroznyak@gmail.com