

БИОХИМИЯ

УДК 577.218
DOI: 10.26456/vtbio251

АНАЛИЗ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА РЕШЕНИЕ О ПЕРЕНОСЕ МОЗАИЧНЫХ ЭМБРИОНОВ НА ЭТАПЕ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

К.В. Федотова, А.Н. Панкрушина
Тверской государственной университет, Тверь

При анализе итогов проведения преимплантационного генетического тестирования, предоставленных тверской медицинской лабораторией ООО «Медикал Геномикс», выявлены факторы, позволяющие сформировать заключение о дальнейших действиях с мозаичными эмбрионами. После обобщения полученных результатов составлены рекомендации по их отбору. Не рекомендованы к переносу мозаичные эмбрионы с дополнительной анеуплоидией, с 3 и более связанными с мозаицизмом хромосомами, с абберациями по 13, 14, 16, 18, 21, X и Y хромосомам. Рекомендована консультация генетика для мозаичных эмбрионов, у которых отсутствуют сопутствующие анеуплоидии, с 1-2 задействованными в мозаицизме хромосомами, с генетическими мозаичными дефектами по всем хромосомам, кроме 13, 14, 16, 18, 21, X и Y, преимущественно с мозаичными делециями и дупликациями.

Ключевые слова: преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ), анеуплоидии, мозаицизм, перенос мозаичного эмбриона, генетическая консультация, критерии отбора эмбрионов на преимплантационной стадии развития.

Введение. Репродуктивная медицина использует методы преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) в качестве отдельного этапа, осуществляемого в рамках программы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). ПГТ объединяет все виды генетического анализа наследственного материала ооцитов и эмбрионов, которые проводятся перед имплантацией в слизистую оболочку матки (Корсак, 2019). ПГТ-А, или преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии, позволяет выявить различные хромосомные аномалии как в полной, так и в мозаичной форме.

Решение о переносе эмбриона принимается в зависимости от определённого хромосомного статуса. Наиболее предпочтительны для переноса эмбрионы, не имеющие хромосомных аббераций. Не

рекомендованы к переносу анеуплоидные эмбрионы, у которых выявлены численные или структурные хромосомные аномалии. Мозаицизм представляет третий, промежуточный, хромосомный статус эмбриона (Preimplantation Genetic Diagnosis International Society, 2016).

Мозаицизм – это явление, при котором в организме присутствуют две и более клеточные популяции, генетически отличающиеся друг от друга. Многоклеточный организм, в тканях которого выявлены разнородные клеточные линии, называется мозаиком (Петровский, 1981).

Перенос мозаичного эмбриона – это дискуссионный вопрос, встречающий сложности медицинского и этического характера. По данной причине обсуждение проблемы проводится с участием врача-генетика, который консультирует супружескую пару о потенциальных рисках, связанных с феноменом мозаицизма.

Как правило, большинство пар соглашается на повторный цикл ЭКО, ожидая получить эуплоидных эмбрионов. Треть пациентов принимает решение о переносе эмбриона с тем или иным уровнем мозаицизма. Небольшое количество пациентов оставляет мозаичные эмбрионы на хранение в криобанке. Пациенты, предпринявшие дополнительные попытки в рамках программы ЭКО, получают более успешные результаты в сравнении с пациентами, осуществившими перенос мозаичных эмбрионов. Однако такие факторы, как возраст матери, неудачи предыдущих попыток забеременеть, финансовые проблемы могут сделать приоритетным процесс подсадки эмбрионов с некоторым уровнем мозаицизма (Besser, 2019).

Исследования учёных демонстрируют различные результаты по переносу мозаичных эмбрионов. Впервые репродуктивный потенциал мозаиков был доказан после успешной имплантации трети эуплоидно-анеуплоидных бластоцист и дальнейшего формирования из них эуплоидных эмбрионов (Gresco, 2015). Однако частота выкидышей при беременности мозаичными эмбрионами по сравнению с эуплоидными возрастает в 3 раза (Fragouli, 2017). Наименьший потенциал к имплантации выявлен у бластоцист со сложным мозаицизмом, а также с количеством анеуплоидных клеток выше 40% (Munne, 2017). После имплантации бластоцист с уровнем мозаицизма ниже 50% у пациенток чаще отмечается живорождение (Spinella, 2018). Среди прочих групп мозаичных эмбрионов приоритет при отборе имеют сегментарные мозаики, поскольку демонстрируют лучшие показатели выживаемости (Victor, 2019).

В большинстве случаев беременности мозаичными эмбрионами оканчиваются рождением детей с эуплоидным набором хромосом. Однако в единичном случае мозаицизм, зарегистрированный у эмбриона на этапе преимплантационного генетического тестирования,

был подтверждён у новорожденного фенотипически здорового ребёнка (Kahraman, 2020). Данный факт показывает, что для разработки рекомендаций по отбору эмбрионов на преимплантационной стадии развития, важно накопление статистических данных об исходах беременностей мозаичными эмбрионами. Кроме того, для стандартизации и унификации критериев отбора мозаичных эмбрионов необходимо обобщать опыт работы генетических лабораторий. В данной статье представлено исследование, направленное на выявление критериев, которые используются в одном из подобных учреждений.

Цель исследования – провести анализ факторов, влияющих на решение о переносе мозаичных эмбрионов на этапе преимплантационного генетического тестирования.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить распространенность мозаицизма среди различных групп эмбрионов;
2. Выявить наиболее значимые факторы, позволяющие сформировать заключение о дальнейших действиях с мозаичным эмбрионом;
3. Обобщить рекомендации по отбору результатов преимплантационного генетического тестирования.

Методика. В качестве материала для исследования были использованы результаты ПГТ, содержащие информацию о задействованной в мозаицизме хромосоме, выявленных генетических дефектах, рекомендации эмбрионов для консультации генетика или о непригодности к переносу. Сводная таблица о выполненной процедуре ПГТ предоставлена тверской медицинской лабораторией ООО «Медикал Геномикс» с сохранением конфиденциальности личных данных пациентов (таблица 1).

Таблица 1

Образец записи итогов ПГТ

| Mosaic | Result | Recommendation |
|--------|----------------------------|--|
| 6 | Seq[GRCh37] (6)x1[0.24] | Рекомендована консультация генетика |

В первом столбце указывается хромосома или участок хромосомы, по которому детектирован мозаицизм. Второй столбец демонстрирует вид мозаичной хромосомной аномалии и долю анеуплоидных клеток в образце трофэктодермы. В последнем столбце содержатся рекомендации о том, следует направить эмбрион на генетическую консультацию или исключить для продолжения цикла ЭКО. Так, в качестве примера в таблице использован эмбрион с мозаичной моносомией по 6 хромосоме с 24% анеуплоидных клеток, для которого рекомендована консультация генетика.

Для проведения преимплантационного генетического тестирования отбираются эмбрионы с лучшими морфологическими характеристиками. На пятый день онтогенеза биопсируется несколько клеток трофэктодермы эмбриона. Из взятого образца выделяется ДНК, которая затем подвергается фрагментации на многочисленные участки. Для установления нуклеотидной последовательности исследуемого объекта проводится пробоподготовка, включающая полногеномную амплификацию и подготовку ДНК-библиотеки, а также анализ на секвенаторе. Данные, полученные после секвенирования, направляются на биоинформатическую обработку. В итоге формируется заключение, представленное в виде таблицы, некоторые графы которой продемонстрированы выше (таблица 1).

Результаты и обсуждение. Данные ПГТ собраны за период с 2017 года до апреля 2021 года. Всего было протестировано 5566 эмбрионов, из которых у 880 выявлен мозаицизм, что составляет 16% случаев (рис. 1). Частота встречаемости мозаицизма немного ниже средней в сравнении с другими центрами ВРТ, где она варьирует от 2% до 40% (Информационное письмо Международного общества ПГД, 2019).

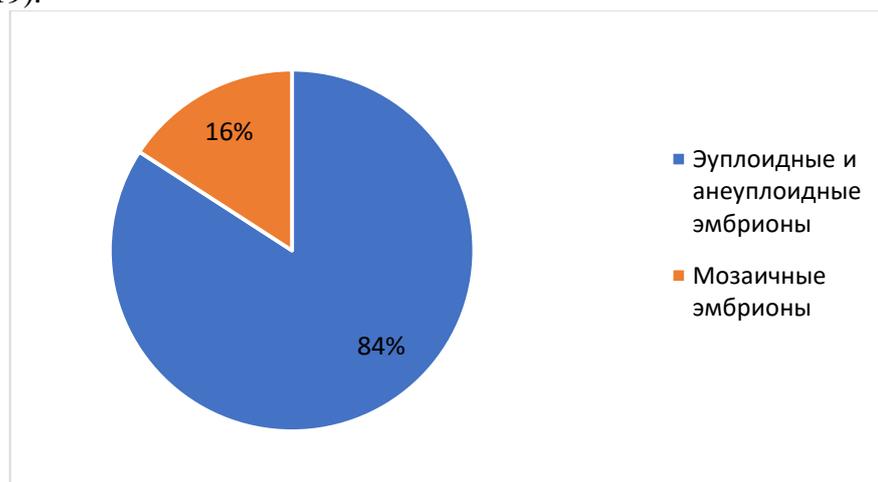


Рис. 1. Частота мозаичных эмбрионов среди итоговых результатов ПГТ

Среди исследуемых эмбрионов были обнаружены следующие виды нарушений: мозаичные моносомии, мозаичные трисомии, мозаичные делеции, мозаичные дупликации (рис.2). Наиболее часто детектированы мозаичные моносомии, наиболее редко – мозаичные дупликации. В целом, преобладает затрагивающий целые хромосомы хромосомный мозаицизм, к которому относятся мозаичные моносомии и мозаичные трисомии. Наименее часто встречается сегментарный мозаицизм, поражающий участки хромосом. Он подразделяется на мозаичные делеции и мозаичные дупликации.

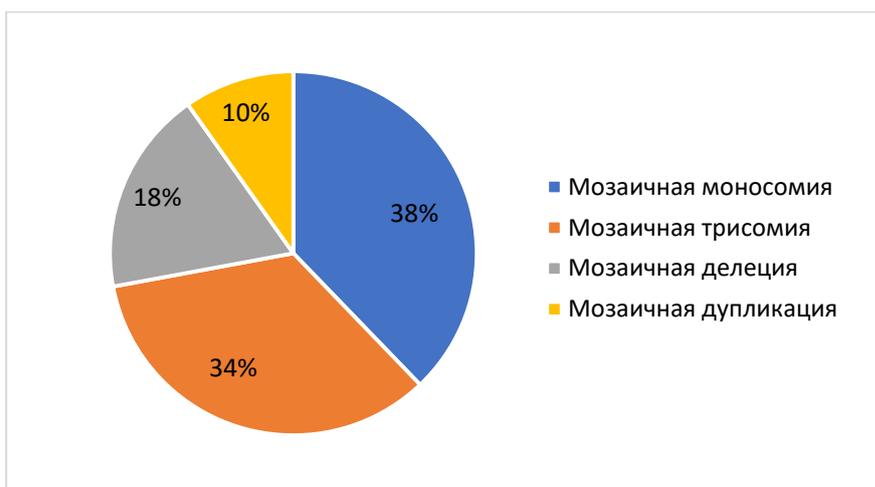


Рис. 2. Частота встречаемости мозаичных дефектов среди итоговых результатов ПГТ

Среди мозаичных эмбрионов не выявлено ни одного, рекомендованного к переносу. Из 880 исследуемых результатов ПГТ 354 относятся к категории «не рекомендованы к переносу», для 526 рекомендована консультация генетика (рис. 3). В ходе исследования проанализировано влияние на принятие экспертного решения следующих факторов: наличие сопутствующих генетических аномалий (полные моносомии, трисомии, делеции, дупликации), количество хромосом, вовлечённых в анеуплоидию, задействованная хромосома, вид мозаичной хромосомной аномалии, а также уровень мозаицизма.

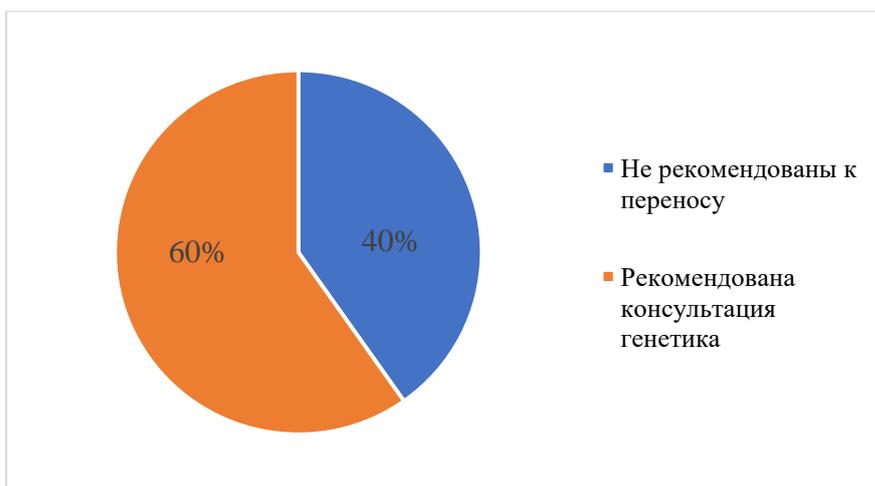


Рис. 3. Соотношение мозаичных эмбрионов с различными вариантами заключения по результатам ПГТ

Дополнительное полное или сегментарное количественное изменение генетического материала хромосом – часто встречающееся явление среди не рекомендованных для переноса эмбрионов, зарегистрированное в 38% случаев. Однако для направляемых на консультацию генетика мозаиков сопутствующая анеуплоидия выявлена в единичном случае, а обсуждение вопроса о подсадке подобного эмбриона имеет место в частных ситуациях. Таким образом, наличие сопутствующей анеуплоидии позволяет отнести эмбрион к группе не рекомендованных к переносу в 99% случаев (рис. 4).



Рис. 4. Распределение случаев сопутствующей анеуплоидии среди мозаичных эмбрионов с различными заключениями по результатам ПГТ

У не рекомендованных к переносу и направляемых на консультацию результатов ПГТ в мозаицизм вовлечено разное количество хромосом. Диапазон числа аномальных хромосом шире у не пригодных для переноса эмбрионов и составляет от одной до одиннадцати. У выносимых на обсуждение о потенциально возможной подсадке он сужается до 1-3 хромосом (рис. 4). В указанной группе мозаицизм по 3 хромосомам детектирован в единственном случае, который может быть исключительным. Однозначно не рекомендуются для дальнейшей имплантации эмбрионы с более, чем тремя хромосомами. Если мозаицизм затрагивает 3 хромосомы, то с частотой 97,4% эмбрион не рекомендован к переносу. Когда в генетическом дефекте задействованы одна или две хромосомы, возможны различные варианты заключения.

Таблица 2

Распределение мозаичных дефектов по количеству задействованных хромосом среди эмбрионов с различными заключениями по результатам ПГТ

| Количество хромосом, связанных с мозаицизмом | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 7 | 11 |
|--|-----|----|----|----|----|---|----|
| Количество мозаичных дефектов среди не рекомендованных для переноса эмбрионов | 84 | 60 | 37 | 22 | 14 | 2 | 1 |
| Количество мозаичных дефектов среди эмбрионов, рекомендованных для консультации генетика | 455 | 70 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Важную роль в формировании заключения играет хромосома, по которой обнаружен мозаицизм. Установлено, что для переноса не пригодны эуплоидно-анеуплоидные эмбрионы по 13, 14, 16, 18, 21 аутосомам и по половым хромосомам. Чаще рекомендуются к консультации эмбрионы с мозаичными формами анеуплоидий по 1, 2, 9 хромосомам, реже – по 16, 18 и 21. Также низка частота назначения консультации для мозаиков по 13, 14, 15 аутосомам и по половым хромосомам (рис. 5). Итак, при выявлении мозаицизма по 13, 14, 16, 18, 21, X, Y хромосомам эмбрион с высокой вероятностью не будет пригоден для подсадки. Если мозаичные анеуплоидии обнаружены по оставшимся хромосомам, то эмбрион может быть рекомендован к генетической консультации.

Следующим значительным фактором, способным повлиять на выбор одного из альтернативных вариантов заключения, является вид анеуплоидии в мозаичной форме. Среди не рекомендованных к переносу эмбрионов наблюдается многократное преобладание мозаичных моносомий и трисомий над мозаичными делециями и дупликациями (рис. 6). При этом последним сопутствуют целочисленные аномалии в мозаичной форме, затрагивающие 14, 16, 18, половые хромосомы. Среди эмбрионов, для которых назначено генетическое консультирование, количественно преобладают сегментарные мозаичные нарушения. Необходимо отметить, что мозаичным делециям и дупликациям сопутствуют мозаичные дефекты, не связанные с хромосомами 13, 14, 16, 18, 21, X и Y. Поскольку

сегментарные генетические aberrации встречаются с частотой 96,6% среди рекомендованных для генетического консультирования, они позволяют включить эмбрион в данную группу.



Рис. 5. Распределение одинарных мозаичных мутаций по хромосомам среди эмбрионов с различными заключениями по результатам ПГТ

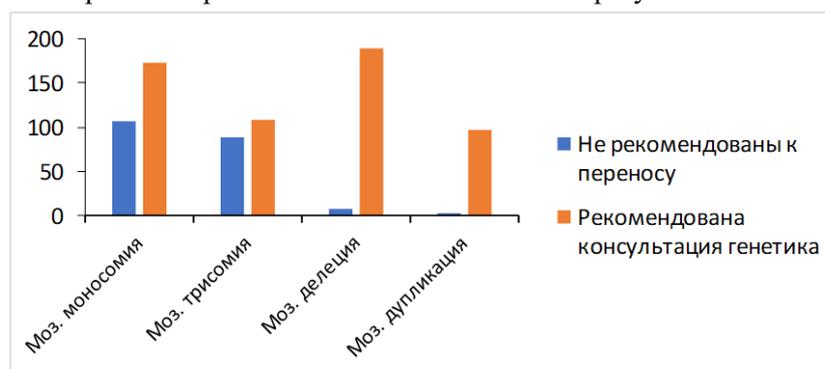


Рис. 6. Распределение мозаичных дефектов в зависимости от их вида среди эмбрионов с различными заключениями по результатам ПГТ

При сравнении частоты встречаемости эмбрионов с разным уровнем мозаицизма у не рекомендованных к переносу и рекомендованных к консультации врача эмбрионов не было выявлено различий. Наиболее многочисленны среди двух групп результаты ПГТ-А с 30-38% анеуплоидных клеток. У наименьшего числа эмбрионов наблюдается 70-80% мозаицизм (рис. 7). Таким образом, уровень мозаицизма не является фактором, от которого зависит решение о потенциальной пригодности или непригодности эмбриона для имплантации.

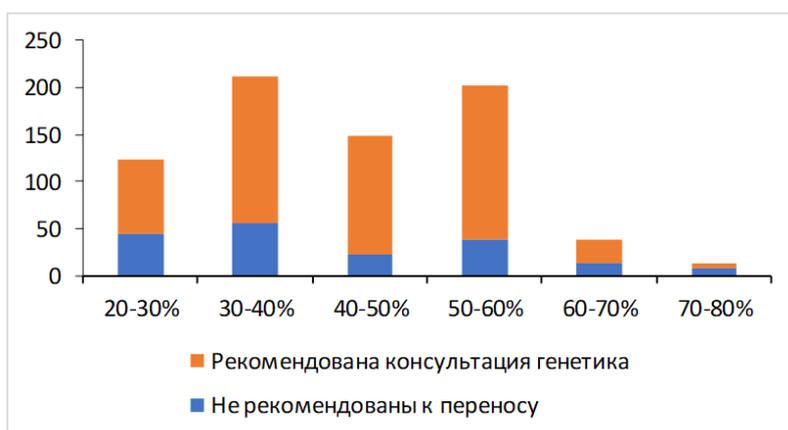


Рис. 7. Распределение мозаичных нарушений в зависимости от уровня мозаицизма среди эмбрионов с различными заключениями по результатам ПГТ

Заключение. Проведённый анализ результатов преимплантационного генетического тестирования 5566 эмбрионов, из которых у 880 был выявлен мозаицизм, показал, что на принятие решения о дальнейших действиях с мозаичным эмбрионом оказывают влияние следующие факторы: наличие сопутствующей анеуплоидии, количество вовлечённых в анеуплоидию хромосом, задействованная хромосома и вид мозаичной хромосомной аномалии. Не рекомендованы к переносу мозаичные эмбрионы с дополнительной моносомией, трисомией, делецией или дупликацией, с 3 и более связанными с мозаицизмом хромосомами, с абберациями по 13, 14, 16, 18, 21, X и Y хромосомам. Рекомендована консультация генетика для мозаичных эмбрионов, у которых отсутствуют сопутствующие моносомии, трисомии, делеции или дупликации, с 1-2 задействованными в мозаицизме хромосомами, с генетическими мозаичными дефектами по всем хромосомам, кроме 13, 14, 16, 18, 21, X и Y, преимущественно с мозаичными делециями или мозаичными дупликациями.

Авторы выражают благодарность сотрудникам тверской медицинской лаборатории ООО «Медикал Геномикс» за оказание помощи в выборе актуальных вопросов для исследования, за разрешение на использование данных таблицы с итогами ПГТ и высококвалифицированное консультирование.

Список литературы

- Информационное письмо* Международного общества ПГД от 27 мая 2019 г. // Проблемы репродукции. Т. 25. № 4. С. 8-12.
- Корсак В.С.* 2019. Руководство по клинической эмбриологии. М: СИМК. 224 с.
- Петровский Б.В.* 1981. Большая медицинская энциклопедия. В 30 т. Т. 15. Меланома – Мудров. М: Сов. энциклопедия. 224 с.
- Besser A.G., Mcculloh D.H., Grifo J.A.* 2019. What are parents doing with their mosaic embryos? // *Fertility and Sterility*. V. 111. P. 132-137.
- Greco E., Minasi M.G., Florentino F.* 2015. Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts // *The New England journal of medicine*. V. 373. P. 2089-2090.
- Fragouli E., Alfarawati S., Spath K.* 2017. Analysis of implantation an ongoing pregnancy rates following the transfer of diploid-aneuploid blastocysts // *Human Genetics*. V. 136. P. 805-819.
- Kahraman S., Cetinskaya M., Yuksel M.* 2020. The birth of a baby with mosaicism resulting from a known mosaic embryo transfer: a case report // *Human Reproduction*. V. 35. № 3. P. 727-733.
- Munne S., Blazek J., Large M.* 2017. Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing // *Fertility and Sterility*. V. 108. P. 62-71.
- Preimplantation Genetic Diagnosis International Society.* 2016. PGDIS position statement on chromosome mosaicism and preimplantation aneuploidy testing at the blastocyst stage. PGDIS Newsletter, July 19, 2016 [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://pgdis.org/docs/newsletter_071816.html (дата обращения: 29.03.2022).
- Spinella F., Fiorentino F., Biricik A.* 2018. Extent of chromosomal mosaicism influences the clinical outcome of in vitro fertilization treatments // *Fertility and Sterility*. V. 109. P. 77-83.
- Victor A., Tyndall J., Brake A.* 2019. One hundred mosaic embryo transferred prospectively in a single clinic: exploring when and why they result in pregnancies // *Fertility and Sterility*. V. 111. № 2. P. 280-293.

ANALYSIS OF FACTORS INFLUENCING THE DECISION TO TRANSFER MOSAIC EMBRYOS AT THE STAGE OF PREIMPLANTATION GENETIC TESTING

K.V. Fedotova, A.N. Pankrushina
Tver State University, Tver

When analyzing the results of preimplantation genetic testing provided by the Tver medical laboratory of Medical Genomics LLC, factors were identified that make it possible to form a conclusion about further actions with mosaic embryos. After summarizing the results obtained, recommendations for their

selection were made. Mosaic embryos with additional aneuploidy, with 3 or more chromosomes associated with mosaicism, with deviations from 13, 14, 16, 18, 21, X- and Y-chromosomes are not recommended for transfer. Mosaic embryos that lack concomitant aneuploidy, with 1-2 chromosomes involved in mosaicism, with genetic mosaic defects on all chromosomes, except 13, 14, 16, 18, 21, X and Y, mainly with mosaic deletions and duplications, are recommended for consultation by a geneticist.

Keywords: *preimplantation genetic testing (PGT), aneuploidies, mosaicism, mosaic embryo transfer, genetic consultation, criteria for the selections of embryos at the preimplantation stage of development.*

Об авторах:

ФЕДОТОВА Кристина Васильевна – магистрант 2 курса биологического факультета по направлению 06.04.01 Биология, (программа «Медико-биологические науки»), ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33; e-mail: bio.biology@tversu.ru.

ПАНКРУШИНА Алла Николаевна – доктор биологических наук, профессор кафедры зоологии и физиологии, ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33; e-mail: Pankrushina.AN@tversu.ru.

Федотова К.В. Анализ факторов, влияющих на решение о переносе мозаичных эмбрионов на этапе преимплантационного генетического тестирования / К.В. Федотова, А.Н. Панкрушина // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2022. № 2(66). С. 39-49.