

БИОХИМИЯ

УДК 576.3: [57.086.862+57.088.1]

DOI: 10.26456/vtbio370

ПАТОЛОГИИ ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ (ПГТ)

А.Н. Панкрушина, И.А. Калиничева

Тверской государственный университет, Тверь

В репродуктивной медицине успешно применяется процедура преимплантационного генетического тестирования (ПГТ), позволяющая идентифицировать широкий спектр хромосомных аномалий и усовершенствовать вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ). Нами установлено, что 16% из 5566 исследованных эмбрионов за период с 2017 года по апрель 2022 года на преимплантационной стадии развития имеют различные формы и виды мозаичных нарушений. Преобладающей формой мозаицизма является хромосомная, а тип – мозаичная моносомия. Смешанная форма мозаицизма и мозаичные дупликации встречаются реже. Наибольшее количество мозаичных мутаций было обнаружено на половых хромосомах. Пол плода определяли в образцах плазмы крови женщин на сроке от 9 до 26 недель беременности. Ген SRY был идентифицирован в 217 образцах (мужчины), в 216 образцах ген SRY отсутствовал (женщины). Зависимости определения гена SRY от срока гестации не обнаружено. Срок беременности в 9-10 недель достаточен для определения пола плода. Полученные сводные данные позволяют оценить целый комплекс проблем, связанных с генетическими аномалиями эмбриона, и разработать дальнейшую гипнотерапию совместно с эмбриологом для сохранения эмбриона или, в случае летальных показателей

Ключевые слова: преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ), ДНК плода (внДНК), ген пола–SRY, мозаичные нарушения, вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ).

Введение. Новейшие высокочувствительные методы ПГТ способны идентифицировать широкий спектр хромосомных аномалий, среди которых анеуплоидии, моногенные мутации, структурные перестройки, а также мозаичные состояния. Хромосомный и сегментарный мозаицизм эмбрионов на преимплантационном этапе развития – это малоизученное явление, информация о котором накапливается стремительно ввиду актуальности проблемы (Besser, 2019; Greco, 2015).

Научный интерес представляет промежуточный статус мозаичного эмбриона, который не позволяет однозначно рекомендовать или не рекомендовать его к переносу. Данные о переносе мозаичных эмбрионов и его влиянии на течение беременности противоречат друг другу, оставляя неоднозначность в вопросе последствий проведения данной манипуляции (Kahraman, 2020).

Данное обстоятельство делает актуальным два аспекта проблемы мозаичных эмбрионов. С одной стороны, важно изучать встречаемость и распределение мозаичных дефектов по хромосомам, что позволит в будущем корректировать генетические нарушения (Munne, 2017). С другой стороны, нельзя исключать возможность переноса мозаичных эмбрионов для определённых групп пациентов. Одним из важных шагов ПГТ является определение ген-SRY пола эмбриона. Идентифицировано более 100 заболеваний человека, наследование которых сцеплено с полом. Примерами таких заболеваний являются гемофилия, гипоплазия надпочечников, мышечная дистрофия. Неинвазивное определение пола особенно актуально в семьях, где оба или один из партнеров является носителем мутации, проявление которой зависит от пола будущего ребенка. В частности, идентификация пола на ранних сроках беременности при наличии в анамнезе у родителей наследственной предрасположенности к врожденной гиперплазии надпочечников позволяет родить здоровую дочь (Панкрушина, 2023). Использование современных методов анализа наследственного материала женских половых клеток и эмбриона способствует усовершенствованию вспомогательных репродуктивных технологий (Аникаев, 2014; Fragouli, 2017).

Методика. В качестве исследуемого материала были использованы сводные данные ПГТ, полученные в Тверской медицинской лаборатории ООО «Медикал Геномикс». Для проведения ПГТ 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. Нами проанализированы результаты генетического тестирования эмбрионов по задействованной в мозаицизме хромосоме, гене SRY, выявленных генетических дефектах, доле анеуплоидных клеток, а также заключение о рекомендации эмбрионов для консультации генетика или

о непригодности к переносу. В процессе сбора материала осуществлено обезличивание индивидуальных данных пациентов.

Результаты и обсуждение. Всего за период с 2017 года до апреля 2022 года было протестировано 5566 эмбрионов, из которых у 880 выявлен мозаицизм, что составляет 16% от общего количества (Федотова, 2022). Мозаицизм встречается в нескольких формах: полный (хромосомный), частичный (сегментарный) или смешанный (рис. 1). Последний включает различные варианты сочетаний хромосомного, сегментарного мозаицизма с другими хромосомными аномалиями (моносомией, трисомией, делецией, дупликацией) и друг с другом. Среди эмбрионов преобладает мозаицизм, затрагивающий целые хромосомы. Наименее часто наблюдаются смешанные формы данного генетического дефекта.



Рис. 1. Соотношение эмбрионов с выявленными формами мозаицизма

К хромосомному мозаицизму относятся наиболее многочисленные среди результатов ПГТ мозаичные моносомии и мозаичные трисомии. Сегментарный мозаицизм, встречающийся в более полутора раз реже, подразделяется на мозаичные делеции и мозаичные дупликации. Среди эмбрионов на преимплантационном этапе развития наиболее часто детектированы мозаичные моносомии, наиболее редко – мозаичные дупликации. Количество обнаруженных мозаичных аномалий всех видов превышает количество эмбрионов, у которых они были зарегистрированы (рис. 2). Соотношение между данными показателями является самым высоким для мозаичной трисомии и составляет 1,5. Впоследствии оно снижается от мозаичной

моносомии (1,2) к мозаичной делеции (1,03) и мозаичной дупликации (1,02). Значит, у одного эмбриона чаще отмечается наличие нескольких мозаичных трисомий или моносомий, а мозаичные сегментарные нарушения наблюдаются преимущественно в единственном числе.



Рис. 2. Частота встречаемости мозаичных дефектов в абсолютных единицах

Максимальное число случаев мозаицизма зарегистрировано по половым хромосомам. Примечательно, что оно превышает среднюю величину почти в два раза. Также количество дефектов выше среднего выявлено в возрастающем порядке по хромосомам 18, 22, 17, 2, 1 и 9.

Нами также проведено определение SRY- гена пола эмбриона, что позволяет на ранних стадиях ПГТ анализа уменьшить риск развития генетических аномалий (Калиничева, 2021; Панкрушина, 2023). Для более четкой диагностики данного гена необходимо учесть некие возможные проблемы с его определением: набор выделения гена – SRY, время доставки пробы, влияние массы тела матери ребенка.

Получены следующие данные, разбивающие некоторые мифы об определении гена SRY. Для сравнения методов выделения внеклеточной ДНК плода при определении гена пола (SRY) было исследовано 10 образцов плазмы женщин на 9-10 неделе беременности. Выделение каждого образца производилось тремя разными наборами для выделения внеклеточной ДНК плода: ДНКПлазма-М-50, производителя ООО «ТестГен» (Россия), ПРОБА-НКФЕТ производителя ООО «ДНК-Технология» (Россия) и набор QIAamp Circulating Nucleic Acid от производителя «QIAGEN» (Нидерланды). Для проведения ПЦР использовался набор «Тест-SRY». Все три используемых нами набора для выделения внеклеточной ДНК

показали сходные результаты по следующим показателям: качество очищенной ДНК, времени выделения пробы и время её хранения. Все перечисленные методики хорошо очищают ДНК для дальнейшей амплификации, время выделения примерно ± 4 часа, время хранения 7 суток (хранение при температуре - 4 °C). Однако стоит отметить, выделение фетальной ДНК на спин-колонках и магнитных частицах оказались наиболее предпочтительны для определения пола плода, так как эти методы требуют меньше всего оборудования для их исполнения и более просты в использовании. При анализе результатов изучения влияния срока беременности на идентификацию гена SRY в фетальной ДНК матери зависимости обнаружено не было. Срок беременности на 9-10 неделях достаточен для определения пола (Панкрушина, 2023).

Для исследования влияния массы тела матери на выявление гена пола (SRY) проанализированы результаты 217 образцов плазмы крови женщин, у которых был идентифицирован мужской пол плода, при этом нормальную массу тела имели 155 женщин, избыточную - 51 и недостаточную - 11. Расчет индекса массы тела производился по формуле:

Индекс массы тела (ИМТ) = $\frac{m}{h^2}$; где m — масса тела в кг., h - рост в

метрах. Интерпретация значений: ниже 18,5 - недостаточный вес, от 18,5 до 24,9 - нормально, от 25 - избыточный вес.

Нами не было выявлено различий между результатами образцов плазмы крови женщин с нормальной массой тела и повышенной, т.е. высокий ИМТ не является противопоказанием к проведению исследования по определению пола.

Нами также изучено влияние условий транспортировки биологического материала в лабораторию на результат анализа по определению гена SRY в фетальной ДНК плазмы крови беременных женщин. Проводилось сравнение результатов 310 образцов, забранных в пробирки CPDA (антикоагулянт: натрия цитрат, глюкоза, лимонная кислота, натрия фосфат, декстроза, аденин) с 10 образцами крови, забранных в пробирки Cell-Free DNA BCT Streck (США) объемом 10 мл. и 29 образцов, транспортировавшихся в пробирках для крови LBgard Biomatrix (США). Среди пробирок типа Streck, в 6 образцах идентифицировалось наличие гена SRY. В 19 образцах, транспортировавшихся в пробирках Biomatrix определялся ген SRY. В 192 образцах крови, отобранных в пробирки CPDA определяли ген SRY. В результате исследования, пробирки типа CPDA показали наилучший результат – качественный размер выхода плазмы больше, чем у других пробирок. Срок доставки образцов плазмы в течении

двух дней с момента забора крови является наиболее оптимальным для анализа по определению пола – с большой чистотой GAPDH.

Заключение. Установлено, что 16% эмбрионов на преимплантационной стадии развития имеют различные формы и виды мозаичных нарушений. Преобладающей формой мозаицизма является хромосомный, видом – мозаичная моносомия. Менее часто встречаются смешанная форма мозаицизма и мозаичные дупликации. Наибольшее количество мозаичных мутаций обнаружено по половым хромосомам.

Было произведено определение пола плода в образцах плазмы крови женщин, находящихся на 9 по 26 неделях беременности. Ген SRY был идентифицирован в 217 образцах (мужской пол), в 216 образцах ген SRY отсутствовал (женский пол). Зависимости определения гена SRY от срока беременности обнаружено не было. Срок беременности на 9-10 неделях достаточен для определения пола плода. При проведении исследования не было выявлено различий между результатами образцов плазмы крови женщин с нормальной массой тела и повышенной, т.е. высокий ИМТ не является противопоказанием к проведению исследования по определению пола. В результате исследования, пробирки типа CPDA показали наилучший результат. Срок доставки образцов плазмы в течении 2-ух дней является наиболее оптимальным для анализа по определению пола.

Полученные сводные данные позволяют оценить полный комплекс проблем, связанных с генетическими аномалиями эмбриона и разработать вместе с эмбриологом дальнейшую гипнотерапию для спасения эмбриона или же при летальных показателях сделать анализ мутаций и в дальнейшем не допустить их возникновения.

Список литературы

- Аникаев А.Ю., Ломоносов А.М.* 2014. Применение секвенирования нового поколения (NGS) в клинической практике // Лабораторная служба. Т. 3. №1. С. 32-36.
- Инструкция по применению набора реагентов для выявления гена RHD плода в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени «ДНК-Технология» У.: ДНК-Технология, 2017. 30 с.
- Калиничева И.А., Панкрушина А.Н.* 2021. Неинвазивное исследование генетических аномалий эмбрионов человека // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2021. № 4 (64). С. 33-40.
- Панкрушина А.Н., Калиничева И.А., Резникова М.Н.* 2023. Определение гена пола (sry) плода человека в крови матери после 9-10 недели беременности // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2023. № 1 (69). С. 27-33.

- Федотова К.В., Панкрушина А.Н.* 2022. Анализ факторов, влияющих на решение о переносе мозаичных эмбрионов на этапе преимплантационного генетического тестирования // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2022. № 2(66). С. 39-49.
- 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
- Leigh D. et al.* PGDIS position statement on the transfer of mosaic embryos 2021 // *Reproductive biomedicine online rbmojournal.com*. 2022. Режим доступа: [https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(22\)00150-X/fulltext#relatedArticles](https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(22)00150-X/fulltext#relatedArticles).
- 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 Режим доступа: https://pgdis.org/docs/newsletter_071816.html.

PATHOLOGIES OF THE HUMAN EMBRYO DETECTED USING THE METHOD OF PREIMPLANTATION GENETIC TESTING (PGT)

A.N. Pankrushina, I.A. Kalinicheva
Tver State University, Tver

The procedure of preimplantation genetic testing (PGT) allows identifying a wide range of chromosomal abnormalities. The emergence of modern methods of analyzing the hereditary material of female germ cells and the embryo has led to the improvement of assisted reproductive technologies (ART). We found that 16% of the 5566 embryos studied for the period from 2017 to April 2022 at the preimplantation stage of development have various forms and types of mosaic disorders. The predominant form of mosaicism is chromosomal, and the type is mosaic monosomy. A mixed form of mosaicism and mosaic duplications are less common. The largest number of

mosaic mutations was found on the sex chromosomes. The fetal sex was determined in blood plasma samples of women who were 9 to 26 weeks pregnant. The SRY gene was identified in 217 samples (male), in 216 samples the SRY gene was absent (female). The dependence of the SRY gene definition on the gestation period was not found. The gestation period at 9-10 weeks is sufficient to determine the sex of the fetus. The obtained summary data allow us to assess a whole range of problems associated with genetic anomalies of the embryo, and to develop further hypnotherapy together with the embryologist to save the embryo or, in case of lethal indicators, to analyze mutations and prevent their occurrence in the future.

Keywords: *preimplantation genetic testing (PGT), fetal DNA (vDNA), sex gene – SRY, mosaic disorders, assisted reproductive technologies (ART).*

Об авторах:

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

КАЛИНИЧЕВА Ирина Антоновна – аспирантка 4 года обучения направления «Биохимия», ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33 e-mail: ira.kalinicheva@internet.ru.

Панкрушина А.Н. Патологии эмбриона человека, выявляемые с использованием метода преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) / А.Н. Панкрушина, И.А. Калиничева // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2024. № 3(75). С. 26-33.

Дата поступления рукописи в редакцию: 17.04.24

Дата подписания рукописи в печать: 01.09.24