

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА
ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ »

ВЕРЛІНСЬКИЙ ОЛЕГ ЮРІЙОВИЧ



УДК: 577.21:57.088.7:618.177-089.888.11

**РОДИННО-СПЕЦИФІЧНИЙ ДИЗАЙН ПОПЕРЕДЖЕННЯ
МОНОГЕННОЇ ТА ХРОМОСОМНОЇ ПАТОЛОГІЇ ЛЮДИНИ
У ДОІМПЛАНТАЦІЙНИЙ ПЕРІОД**

03.00.22 – молекулярна генетика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертація є рукописом

Робота виконана на кафедрі акушерства і гінекології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Федота Олена Михайлівна,
Харківський національний університет
імені В. Н. Каразіна, професор кафедри
акушерства і гінекології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Петрушко Марина Павлівна,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
Національної академії наук України,
завідувач відділу кріобіології системи репродукції

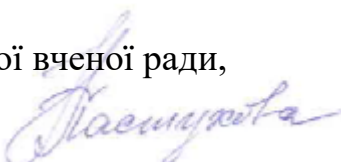
доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Лозинська Марія Ростиславівна,
Державна установа «Інститут спадкової патології
Національної академії медичних наук України»,
провідний науковий співробітник

Захист відбудеться 8 вересня 2021 р. о 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а; тел./факс: (044)463-05-32, e-mail: d26.254.01.@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

Автореферат розісланий « ____ » серпня 2021 р.

Учений секретар спеціалізованої вченої ради,
к.б.н, доц.

 Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. У теперішній час сім'ї в розвинених країнах відтермінують народження дитини. Зрілий вік потенційних батьків пов'язаний з погіршенням морфофункціонального стану гамет, ризиком генетичних порушень репродукційних клітин та ембріонів, що є показанням застосування допоміжних репродукційних технологій (ДРТ). В результаті лікування безпліддя методами ДРТ у світі народилося понад 5 мільйонів немовлят, що щорічно складає майже 350 000 дітей. Очікується, що ця кількість буде зростати та впливати на показники генетичного тягаря, економічне та соціальне навантаження населення, оскільки в 95% лікувальних циклів запліднення *in vitro* (ЗІВ) генетичне тестування ембріонів не проводиться (Peters, 2015, Ferraretti et al., 2013; Steptoe, Edwards, 1978; Griffin, Ogur, 2018).

Найбільш поширеною та інтернаціональною категорією пацієнтів, яким показане лікування методами ДРТ із застосуванням преімплантаційного генетичного тестування (ПГТ), є особи з родин з моногенними порушеннями та специфічними хромосомними аномаліями, зокрема, збалансованими транслокаціями хромосом (Wilch, Morton, 2018; ESHRE PGT Consortium Steering Committee, Carvalho et al., 2020; DeRycke, Berckmoes, 2020; Zhang et al., 2018). Транслокації можуть не викликати фенотипових змін та не заважати соціальній ролі людини, але можуть спричиняти погіршення репродукційної функції або появу нащадків з хромосомними патологіями (Wilch, Morton, 2018; Tšuiiko et.al., 2019; Aristidou et.al., 2017). Для носіїв мутацій, які обумовлюють моногенні захворювання, ДРТ з використанням ПГТ, зазвичай, є єдиною можливістю мати здорових дітей.

Всі варіанти ПГТ, преімплантаційного генетичного тестування анеуплоїдій/структурних перебудов (ПГТ-А/СП) та моногенних порушень (ПГТ-М), призначені для мінімізації шансів перенесення генетично аномальних ембріонів, які утворилися в результаті ЗІВ (Griffin, Ogur, 2018; ESHRE PGT Consortium Steering Committee, Carvalho et al., 2020; DeRycke, Berckmoes, 2020), тому для отримання ефективних результатів молекулярно-генетичного/цитогенетичного аналізу важливо визначити об'єкт і завдання, необхідність попередніх етапів дослідження, ступінь точності очікуваних результатів.

Унікальні потреби окремих пацієнтів, відмінності нормативних вимог та методик лабораторної діагностики, юридичні та релігійні обмеження обумовлюють різницю методологічних підходів щодо ПГТ, особливо при виконанні молекулярних досліджень (ESHRE PGT Consortium Steering Committee, Carvalho et al., 2020). Оскільки в межах відповідного законодавства правила та умови виконання ПГТ можуть варіювати не тільки між країнами, але і між медичними установами (ESHRE PGT Consortium Steering Committee, Carvalho et al., 2020), актуальним є формування власних підходів до ПГТ з урахуванням біологічних особливостей родин пацієнтів. Саме тому аналіз та порівняння результатів генетичних досліджень, проведених у різних родин, розширює можливості їх практичного застосування, зокрема, для підвищення результативності ДРТ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в межах науково-дослідної теми «Генетичні передумови розвитку та корекції спадкової патології на різних етапах онтогенезу людини та тварин» (№ держреєстрації 0116U005341, 2016–2019 рр., № держреєстрації 0119U102493, 2019–2022 рр.) ХНУ імені В. Н. Каразіна.

Мета і завдання дослідження. Мета дослідження – визначення генетичних особливостей батьків-носіїв хромосомних і генних мутацій та їхніх ембріонів для оптимізації преімплантаційного генетичного тестування анеуплоїдій/структурних перебудов (ПГТ-А/СП) і моногенних порушень (ПГТ-М).

Для досягнення поставленої мети були вирішені такі завдання:

1. Проаналізувати генетичні та морфокінетичні характеристики преімплантаційних ембріонів на третю та п'яту добу розвитку *in vitro* для їх подальшого використання у програмах ПГТ-А/СП та ПГТ-М.

2. Визначити генетичні характеристики осіб із родин носіїв транслокацій хромосом, які доцільно врахувати при ПГТ-А/СП.

3. Оцінити діагностичну значущість молекулярно-цитогенетичних та молекулярно-генетичних методів для ідентифікації реципрокних транслокацій при ПГТ-А /СП.

4. Визначити генетичні особливості родин з груп ризику щодо моногенної патології, які доцільно врахувати у програмах ПГТ-М.

5. Порівняти підходи до застосування різних методів генетичного аналізу щодо визначення мутацій та їхніх поєднань при ПГТ-М.

6. Запропонувати рекомендації щодо оптимізації ПГТ-А /СП та ПГТ-М з урахуванням генетичних особливостей родин з показаннями до ДРТ.

Об'єкт дослідження: генетичні особливості преімплантаційних ембріонів пацієнтів із хромосомними та моногенними порушеннями.

Предмет дослідження: закономірності впливу хромосомного та генного статусу батьків на генетичні характеристики ембріонів з індивідуалізацією підходів до ПГТ-А/СП та ПГТ-М для підвищення ефективності ДРТ.

Методи дослідження: молекулярно-генетичні, молекулярно-цитогенетичні, цитогенетичні, світлова мікроскопія, культивування *in vitro*, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Доведено, що преімплантаційне генетичне тестування ембріонів доцільно проводити на п'яту добу їх розвитку *in vitro*. Доведено, що стать потенційного батька, носія реципрокної транслокації, доцільно врахувати при плануванні ПГТ-А/СП – в родин, в яких носієм транслокації був чоловік, здорові діти народжувались в 1,4 рази частіше, ніж в родин, в яких носієм транслокації була жінка. Визначено, що співставні результати при застосуванні методів NGS та FISH для оцінки хромосомного набору отримано для 78,6 % ембріонів на п'яту добу розвитку. Встановлена негативна кореляція між віком батьків та кількістю ембріонів з еуплоїдним набором хромосом, тому застосування ПГТ-А під час ПГТ-М підвищує результативність ДРТ до 66,3%. Показано, що HLA-типизація під час преімплантаційного генетичного тестування генних мутацій та анеуплоїдій дає можливість народження здорового HLA-ідентичного донора для лікування осіб з патологіями, що потребують аlogenної трансплантації кісткового мозку. Встановлено, що при ПГТ у родин, в яких є носії мутацій

de novo результати застосування різних методик при дослідженні біологічних зразків від батьків обох статей для оцінки мутації мають співставні показники на рівні 86% ідентифікації здорових ембріонів.

Практичне значення отриманих результатів. Запропоновано підходи до оптимізації та обґрунтування рекомендацій щодо виконання преімплантаційного генетичного тестування із застосуванням молекулярно-генетичних/цитогенетичних методів аналізу в родинах осіб із реципрокними транслокаціями та моногенною патологією. Результати досліджень можуть бути включені до навчальних програм загальних та спеціалізованих курсів у закладах вищої освіти біологічної та медичної галузей. Результати роботи застосовує у практичній діяльності репродукційна клініка ТОВ «Медичний центр ІГР», вони також можуть бути впроваджені у практику медичних установ, які працюють у галузі ДРТ.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем спільно з науковим керівником обґрунтовано тему та актуальність дослідження, визначено мету та завдання, обговорено результати. Самостійно проаналізовано інформаційні джерела, прийнято безпосередню участь у розробці дизайну ПГТ-А/СП та ПГТ-М, виконано молекулярно-генетичні дослідження для родин з моногенною патологією та вісімдесят відсотків досліджень для родин носіїв транслокацій, проведено ретроспективний аналіз баз даних родин із транслокаціями хромосом та із генетичними та морфологічними ознаками ембріонів, виконано статистичний аналіз, сформульовані основні положення і висновки роботи. Аналіз результатів, узагальнення та підготовку публікації проведено автором або за його безпосередньої участі. Участь колег відображено у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на XIV міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2017), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Біоетика та біобезпека: мультидисциплінарні аспекти», присвяченій 105-річчю пам'яті В. К. Високовича (Харків, 2017), XII міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», присвяченій 50-річчю заснування УТГіС ім. М. І. Вавилова та 130-річчю від дня народження М. І. Вавилова (м. Умань, 2017), на XV, XVI, XVII та XVIII міжнародних наукових конференціях студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2018, 2019, 2020, 2021).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 17 наукових праць, у тому числі: 4 статті у наукових фахових виданнях України; 4 статті у наукових видання, що індексуються у наукометричній базі Scopus; 1 монографія у співавторстві; 8 тез доповідей на міжнародних наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Основний зміст дисертаційної роботи викладено на 112 сторінках друкованого тексту, ілюстровано 20 таблицями та 23 рисунками. Робота складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу й узагальнення, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел літератури, який налічує 218 найменувань, і додатків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріали досліджень. Збір первинної інформації та лабораторні дослідження проведено у ТОВ «Медичний центр ІГР» (м. Київ) та у його партнерських клініках з 2009 по 2020 рр. Під час роботи використано первинну облікову інформацію пацієнтів, медичну документацію, зразки біологічного матеріалу: венозну кров, еякулят, полярні тільця ооцитів, бластомери ембріонів на стадії 8-ми бластомерів, клітини трофектодерми ембріонів на стадії бластоцисти, рідину бластоцелі ембріонів на стадії експандованої бластоцисти.

При оцінюванні генетичних та морфологічних характеристик зигот для прогнозування якості ембріонів, які з них сформується, було проаналізовано показники 352 ооцитів. Проведено ретроспективний аналіз бази даних щодо 69 носіїв транслокацій та 193 ембріона вказаних осіб. Проаналізовано дані 291 носія транслокацій в програмах ПГТ-А/СП з родин, які мали репродукційні порушення. Для порівняння результативності різних методів ПГТ-А проаналізовано дані 70 ембріонів, оцінених кількома методами одночасно, та 287 і 365 ембріонів, генетичні параметри яких отримано різними методами. Для з'ясування результатів ПГТ-М проаналізовано інформацію про 1149 пацієнтів з родин із моногенними патологіями та 4419 ембріонів, отриманих при лікуванні даної групи осіб. Результати одночасного ПГТ-М та ПГТ-А вивчено у 83 родин та 1054 ембріонів. Для оцінки результатів ПГТ мутацій *de novo* проаналізовано матеріали 152 пар та 403 ембріонів.

Дослідження проведено згідно з основними біоетичними нормами Хельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації щодо етичних принципів науково-медичних досліджень із поправками (2000, 2008), Універсальної декларації з біоетики та прав людини (1997), Конвенції Ради Європи з прав людини та біомедицини (1997).

Методи досліджень. *Генетичний аналіз.* Цитогенетичні методи застосовували для аналізу хромосом культивованих лімфоцитів периферичної крові; фарбування препаратів здійснювали за допомогою GTG методу (G-фарбування) (Cytogenetic Nomenclature (2009)). *Молекулярно-цитогенетичний метод, флуоресцентну гібридизацію in situ (fluorescence in situ hybridization, FISH)* використовували при ПГТ анеуплоїдій та структурних перебудов (Lichter, Ried, 2010; Ворсанова, 2006). *Секвенування нового покоління (next generation sequencing, NGS)* застосовували при преімплантаційному генетичному тестуванні анеуплоїдій, структурних перебудов. *Молекулярно-генетичний метод ПЛР* використовували для оцінки генотипів батьків та ПГТ-М. *Оцінювання предиктору розвитку зигот in vitro* для прогнозування потенціалу імплантації ембріону виконували, аналізуючи морфологічні характеристики пронуклеусів відповідно до Z-критеріїв за Скоттом (Scott., Smith, 1998; Scott, 2003). *Оцінку кількісних та якісних характеристик ембріонів* на стадії бластоцисти *in vitro* проводили відповідно до критеріїв якості, розроблених Гарднером (Schoolcraft, 1999; Gardner, Valaban, 2016).

Статистичний аналіз. Розподіл кількісних дат на відповідність закону нормального розподілу перевіряли за методами Колмогорова-Смирнова та Шапіро-Уїлка. Порівняння середніх арифметичних виконували методом Стьюдента. Різницю

частот оцінених параметрів аналізували за допомогою ϕ перетворення Фішера шляхом кутової трансформації. Існування зв'язків між ознаками визначали методом кореляційного аналізу за Пірсоном та Спірменом. При проведенні множинних порівнянь в окремих випадках вводили поправку Бонферроні. Статистичні гіпотези перевіряли за допомогою критеріїв t , χ^2 .

Програмне забезпечення. Бази даних та розрахунки робили за допомогою ПП Microsoft Excel операційної системи Windows XP Professional 1-2 CPU (Microsoft, США), ліцензія № X08-73060. Для обробки зображень цитогенетичних препаратів застосовували програмне забезпечення MetaSystems (ФРН), ліцензія № ISS-0299. Для молекулярно-цитогенетичних досліджень із застосуванням флуоресценції використовували програму Isis (ФРН). Для обробки даних, отриманих при секвенуванні нового покоління, первинні результати автоматично надходили із апарату IonS5 до хмарного інтернет-ресурсу Thermo Fisher Cloud із аналізом даних та формуванням профілей ембріонів. Наявність мутацій визначали із додатком Bio-Rad CFXManager 3.1 (Bio-Rad, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження динаміки розвитку ембріонів із урахуванням морфологічних характеристик зигот. Для визначення оптимального часу відбору ембріонів ми проаналізували кількісні та якісні характеристики 352 ооцитів на різних етапах розвитку (таблиця 1). Розподіл ембріонів за категоріями зигот на третю добу розвитку значуще не відрізнявся ні від рівномірного ($p=0,48$), ні від розподілу ооцитів за категоріями ($p=0,70$). На п'яту добу характер розподілу ембріонів залежно від категорії зигот значуще відрізнявся як від рівномірного ($p<0,001$), так і від показників на третю добу ($p<0,001$). Найбільша кількість ембріонів розвинулася з зигот категорій Z1 і Z2. Для тих же груп відзначена найбільша кількість морфологічно якісних бластоцист градації AA – 69,0% і 60,9% ($p<0,001$).

Таблиця 1

Параметри розвитку ембріонів із зигот різних категорій

Ознака	Z1		Z2		Z3		Z4	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Загальна кількість ооцитів, n	42	100	176	100	124	100	10	100
Кількість ембріонів на 3 добу, n	42	100	170	96,6	115	92,8	8	80,0
Середня кількість бластомерів ембріонів на 3 добу, $\bar{x} \pm s_x$	7,8 \pm 1,2		7,8 \pm 1,8		7,6 \pm 1,7		5,8 \pm 2,0	
Кількість ембріонів на 5 добу (бластоцист)	29	69,1	123	69,9	77	62,1	2	20,0
Кількість бластоцист якості AA, n	20/29	69,0	7/123	60,9	42/77	54,5	0	0,0
Кількість ембріонів з еуплоїдним набором хромосом, n	12/27	44,4	44/93	47,3	21/53	39,6	1/3	33,3
Середній вік жінок, років, $\bar{x} \pm s_x$	30,3 \pm 3,5		30,1 \pm 3,8		30,4 \pm 4,2		30,9 \pm 4,6	

Примітка: N, n – кількість, Z1–Z4 – категорії морфологічної оцінки зигот.

Оскільки морфологічна оцінка пронуклеусів зигот може бути пов'язана із показниками генетичного статусу ембріона (Gianaroli, 2007), ми проаналізували характеристики хромосомного набору ембріонів в залежності від якісної оцінки зигот. Визначено позитивний зв'язок між показниками еуплоїдності ембріонів та середньою кількістю бластомерів ембріонів на третю добу їх розвитку ($r=0,95$, $p=0,05$). Таким чином, дослідження ембріонів доцільно проводити на п'яту добу розвитку, коли можливість відбору життєздатних ембріонів, які походять з зигот категорій Z1-Z3, вища.

Визначення генетичних особливостей носіїв транслокацій з родин, потребуючих ДРТ. Цитогенетичні характеристики носіїв транслокацій. Ретроспективний аналіз даних пацієнтів ТОВ «Медичний центр ІГР» показав, що серед вибірки осіб, які зверталися по допомогу з приводу порушення репродукційної функції ($n = 6156$), частка носіїв транслокацій склала 1,1% ($n = 69$), з яких на реципрокні транслокації припадає дві третини, або 0,7% ($n = 46$), на робертсонівські – третина, або 0,4% ($n = 23$). Оскільки спектр реципрокних транслокацій широкий, ними представлено не менше половини збалансованих аутосомних перебудов людини (Баранов, Кузнецова, 2007), частка ембріонів із незбалансованими транслокаціями від батьків-носіїв вища, ніж при інших хромосомних перебудовах (Mateu-Brull et.al., 2019; Fodina et.al., 2019), ми сфокусували увагу на аналізі реципрокних транслокацій в родин, залучених до програм ПГТ-А/СП. У носіїв реципрокних транслокацій у нашому дослідженні в обміни були залучені усі хромосоми, але розподіл їх частот статистично значуще відрізнявся від рівномірного ($p=0,03$).

Інтерхромосомний ефект, термін розвитку ембріонів під час аналізу і їхні кількісні та якісні характеристики. У вибірці носіїв реципрокних транслокацій, батьків п'ятидобових ембріонів, розподіл показників участі окремих хромосом ($p=0,0003$) та хромосом груп А-Г ($P<0,001$) у транслокаціях значуще відрізнявся від таких у загальній групі осіб-носіїв реципрокних транслокацій, що може бути наслідком тиску добору проти окремих каріотипів. Найбільшу частку ембріонів було отримано від осіб із транслокаціями хромосом груп А та С – 37,0% та 22,5% від усіх досліджених, майже на порядок менше – від осіб із транслокаціями хромосом груп В та D – 3,6% – 2,9% ($p<0,001$). Найбільші частки ембріонів з еуплоїдним та збалансованим набором хромосом відмічено для батьків із транслокаціями хромосом груп В та D – 21,4-18,2% ($p=0,0008$). У 18,8% батьків із транслокаціями метацентричних-acroцентричних хромосом отримані ембріони із еуплоїдними та збалансованими хромосомними наборами, що значуще вище, ніж у інших окремих групах батьків-носіїв транслокацій, наприклад, у осіб із перебудовами субметацентричних-субметацентричних хромосом, 5,6% ($p<0,05$).

В цілому, ембріони п'ятої доби розвитку *in vitro* зі збалансованими транслокаціями склали 20,7% від усіх, що були отримані від батьків з реципрокними транслокаціями, а еуплоїдні ембріони зі збалансованими перебудовами – 13,0%. Таким чином, участь в перебудові будь-якої з хромосом та наслідки інтерхромосомного ефекту є вагомим аргументом на користь ПГТ-А/СП для ефективного визначення незбалансованого хромосомного набору та анеуплоїдій, яке доцільно проводити на п'яту добу розвитку ембріона.

Стать та вік батьків-носіїв транслокації і кількісні та якісні характеристики ембріонів. Співвідношення чоловіків і жінок серед осіб з реципрокними транслокаціями склало 1 : 1,3 ($p=0,238$). Серед осіб, носіїв транслокацій, від яких були отримані і проаналізовані ембріони на п'яту добу розвитку, співвідношення чоловіків і жінок склало 3 : 1 ($p = 1$). Від матерів та батьків, носіїв реципрокних транслокацій, отримано співставні частки ембріонів як із еуплоїдними хромосомними наборами – 28,6% та 30,6%, так із еуплоїдними та збалансованими хромосомними наборами – 14,3% та 12,5%. В той же час, встановлено значущу різницю між матерями та батьками-носіями транслокацій у співвідношенні отриманих ембріонів зі збалансованими та незбалансованими транслокаціями – 1 : 2,8, у порівнянні з 1 : 4,3 ($p=0,049$).

Аналіз результатів щодо показників клінічних вагітностей та народжених дітей після ПГТ-А/СП показав, що здорові діти народилися у 31% родин, в яких носієм транслокації була жінка, та у 43% родин, в яких носієм транслокації був чоловік ($p<0,05$). Таким чином, стать потенційного батька, носія реципрокної транслокації, доцільно врахувати для вибору клінічних протоколів при плануванні ПГТ-А/СП.

Визначено зворотній зв'язок показників віку та кількості отриманих ембріонів ($r=-0,48$, $p=0,02$), віку батьків та кількості еуплоїдних ембріонів як зі збалансованим хромосомним набором ($r=-0,68$, $p=0,0003$), так із незбалансованим ($r=-0,60$, $p=0,02$). Встановлено негативний зв'язок між віком батьків та кількістю ембріонів зі збалансованими реципрокними транслокаціями ($r=-0,53$, $p=0,01$). Оскільки в літературі відмічено особливості рекомбінаційних процесів під час мейозу, які пов'язані зі статтю, віком, швидкістю і локалізацією обмінів (Bhéret, 2017; Lenormand, 2016; Stevison, 2016; Brandvain, 2012), то вони можуть впливати на якість ембріонів із підвищенням віку батьків, що важливо врахувати при плануванні ПГТ.

Оптимізація скринінгу хромосомного набору ембріонів. Порівняння ефективності NGS та FISH технологій: комплексний скринінг 24 хромосом ембріонів. Методи комплексного скринінгу хромосом (KCH, CCS, comprehensive chromosome screening) неоднакові за інформативністю отриманих результатів. Оскільки вибір методології генетичного аналізу, важливість низки параметрів і рівня результатів залежать від об'єкту та завдань дослідження, можливостей дослідників, економічної доцільності та генетичних особливостей родини, ми представили підходи щодо оптимізації ПГТ-А/СП у родинях із носійством транслокацій. Аналіз результатів дослідження клітин трофектодерми ембріонів на п'яту добу розвитку шляхом скринінгу 24 хромосом за технологією NGS, верифікованих методом FISH, показав, що з 64,3% зразків, які отримали однакові генетичні характеристики обома методами, 45,7% ($n=32$) були еуплоїдні, 18,6% ($n=13$) – анеуплоїдні (рис. 1).

Ембріони з різними генетичними характеристиками ми представили декількома групами. Одна група об'єднувала ембріони з характеристиками, які формально можна визначити як «хромосомна патологія ембріона», встановлена обома методами – 14,3%. З них у 7,1% ембріонів в обох дослідженнях виявлено анеуплоїдію, але різних хромосом. Розбіжність результатів відзначено у випадку виявленої анеуплоїдії методом NGS і мозаїцизму з часткою до 50% за плідністю

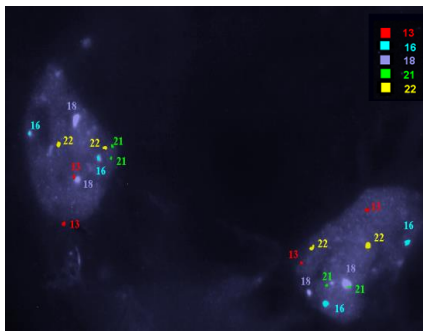
2n/4n методом FISH – 4,3%. У 2,9% ембріонів методом NGS було виявлено анеуплоїдію або мозаїцизм, тоді як методом FISH було виявлено поєднання анеуплоїдії та мозаїцизму.

На рис. 2 наведено приклад результату дослідження зразка, в якому було встановлено мозаїцизм за плоїдністю набору хромосом в ядрах клітин трофектодерми методом FISH (рис. 2). Секвенування показало, що результат дослідження не відрізняється від кривої зразка з нормальним хромосомним набором (рис. 2, б).

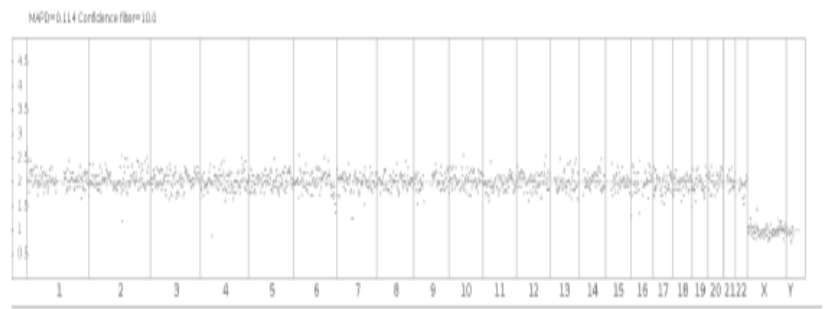
До наступної групи можна віднести випадки, при яких лише при використанні одного методу було виявлено хромосомну аномалію ембріона – анеуплоїдію у 10,0% зразків, причому в 8,6% аномальну кількість хромосом було виявлено методом NGS; 4,3% ембріони мали еуплоїдний набір хромосом за результатом NGS і мозаїчність за плоїдністю 2n/4n згідно з результатами FISH; 5,7% зразків мали нормальний каріотип згідно з даними NGS і мозаїчний за анеуплоїдією / анеуплоїдні згідно результатам FISH і 1,4% – навпаки. Наприклад, секвенування ДНК ембріона, який характеризується моносомією хромосом 18 і 22 за результатами FISH (рис. 3, а), виявило моносомію за хромосомою 18, але моносомія за хромосомою 22 була ідентифікована як норма – показники розподілу кількості ДНК перебували в межах «сірої зони» (рис. 3, б).

12,8% ембріонів, проаналізованих за зразками рідини бластоцелі (РБ) і клітин ТЕ методами NGS і FISH, у 36,3 % випадках мали еуплоїдний набір хромосом без мозаїцизму, але у 54,6% ембріонів було встановлено однакові і різні анеуплоїдії. Виявлено також мозаїцизм одного зразка у ТЕ при дослідженні методом FISH, і в РБ, згідно NGS. Зіставний результат при застосуванні двох методів – виявлення хромосомних аномалій або нормальний хромосомний набір, отриманий нами для 78,6% ембріонів, що характеризує результативність дослідження методом NGS.

Дослідження каріотипу ембріонів методами FISH (n=287) та NGS (n=365) визначило розподіл показників норми : анеуплоїдії : мозаїцизму : поліплоїдії у відношенні 35,6% : 28,9% : 28,2% : 7,3% та 38,9% : 51,8% : 1,6% : 0% ($p < 0,001$). Зіставний показник отримано щодо еуплоїдних ембріонів. Майже вдвічі більше анеуплоїдій визначено методом NGS, 51,8% у порівнянні з 28,9% щодо FISH ($p < 0,001$), що може бути обумовлено особливостями методу NGS щодо детекції статусу усіх хромосом, на відміну від FISH, можливості якого обмежені хромосомами панелі дослідження. В той же час, більш результативним для тестування справжнього мозаїцизму та поліплоїдії є FISH. Під час застосування NGS було виявлено надлишок або нестачу генетичного матеріалу, що можливо врахувати при визначенні незбалансованих транслокацій. Таким чином, доцільним є поєднання методів дослідження ембріонів шляхом ПГТ-А/СП, особливо при їх обмеженій кількості та якості.

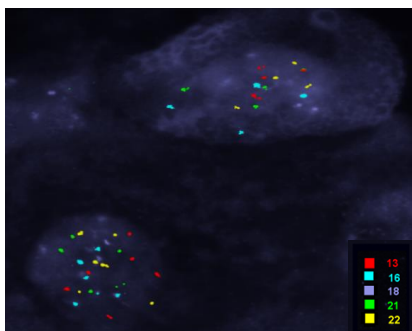


а)

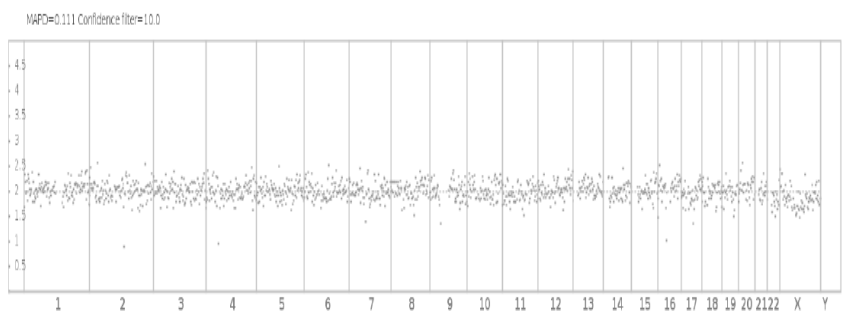


б)

Рис. 1. а) Зображення інтерфазних ядер клітин трофектодерми з флуоресцентними мітками хромосом 13, 16, 18, 21, 22, відповідає еуплоїдному набору хромосом, набір «MultiVysion PB» («Abbott-Vysis», USA); б) Результати секвенування зразка того ж ембріона: еуплоїдний набір хромосом

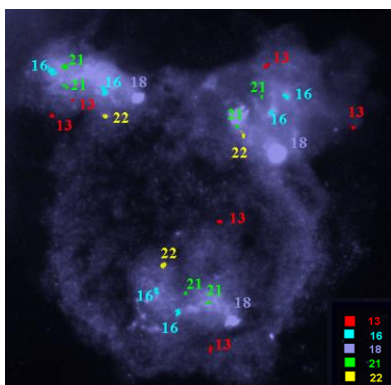


а)

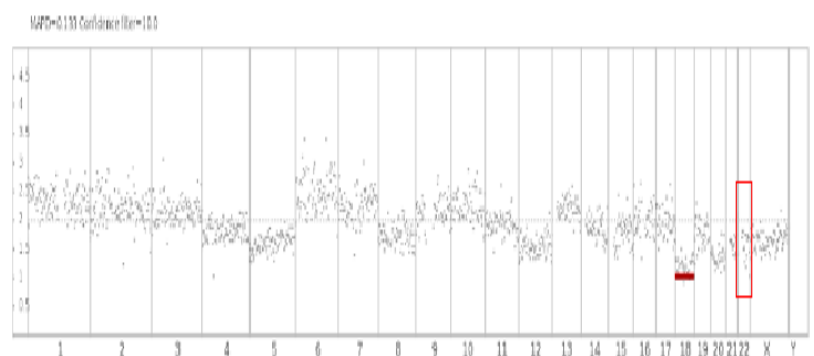


б)

Рис. 2. а) Зображення інтерфазних ядер клітин трофектодерми з флуоресцентними мітками хромосом 13, 16, 18, 21, 22, відповідає поліплоїдному набору хромосом ($4n$ і $6n$), набір «MultiVysionPB» («Abbott-Vysis», USA), збільшення; б) Результати секвенування нового покоління зразка того ж ембріона, показаний еуплоїдний набір хромосом



а)



б)

Рис. 3. а) Зображення інтерфазних ядер клітин трофектодерми з флуоресцентними мітками хромосом 13, 16, 18, 21, 22, відповідає анеуплоїдії хромосом 18 і 22, набір «MultiVysion PB» («Abbott-Vysis», USA); б) Результати секвенування зразка того ж ембріона, показано моносомію 18, не відображено моносомію 22

Приклади визначення транслокацій при ПГТ-А/СП. Необхідність визначення генетичного ризику та алгоритму допомоги родині носіїв реципрокних транслокацій є інтернаціональною проблемою (Tšuikoet.al., 2019; Wilch, Morton, 2018; Aristidouet.al., 2017). Ілюстрацією наших підходів щодо детекції транслокацій при ПГТ-СП слугує родина, в якій жінка є носієм реципрокної транслокації. Материнську траслокацію визначено GTG-методом – каріотип - 46, XX, t(7;9)(q11.23;q21.2), а ембріони досліджено методом NGS (рис. 4, 5), оскільки юридичних та релігійних обмежень щодо дослідження ембріонів не було, а вік подружжя припускав необхідність виключення анеуплоїдії всіх хромосом.

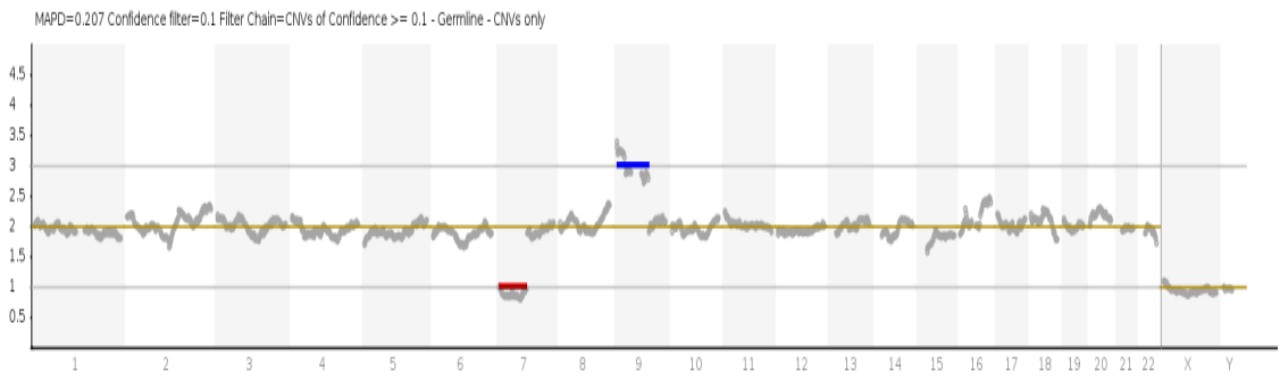


Рис. 4. Результати секвенування зразка ембріона 1. 46,XY,del(7)(p22.3q21.11),dup(9)(p24.3q22.2)

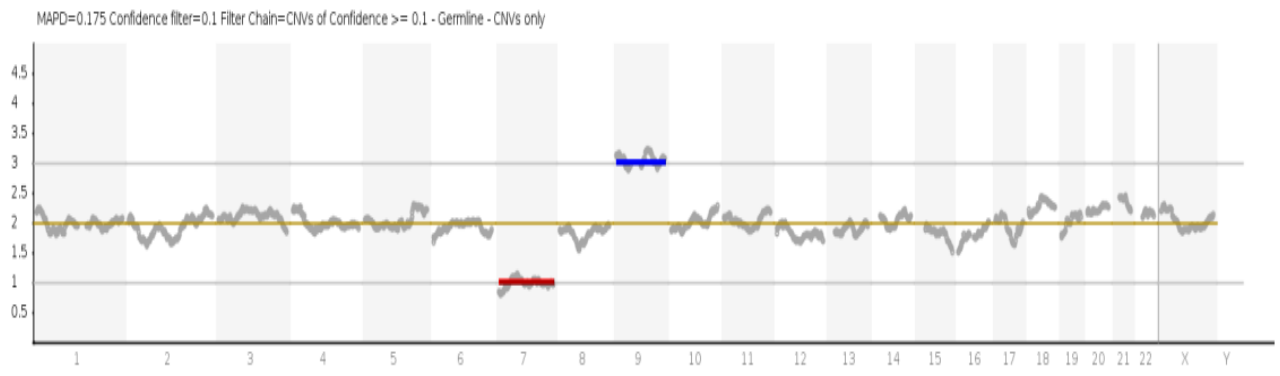


Рис. 5. Результати секвенування зразка ембріона 2. 46,XX,-7,+9

Іншим прикладом є виявлення материнської транслокації – 46,XX,t(2;22)(q21;q11.2) (рис. 6) з подальшим дослідженням ембріону методом FISH в кілька раундів для верифікації сегрегуючої транслокації (рис.7, 8). Юридичних та релігійних обмежень дослідження ембріонів у подружжя не було, вік подружжя не був фактором ризику анеуплоїдії всіх хромосом, та, згідно рекомендацій ESHRE, для детекції транслокацій, у які залучено невеликі хромосоми або фрагменти, ефективним є використання FISH (ESHRE PGT-A/SR Working Group, Coonen et al., 2020; ESHRE PGT Consortium Steering Committee, Carvalho et al., 2020), якщо залучені хромосоми включені до панелі дослідження.

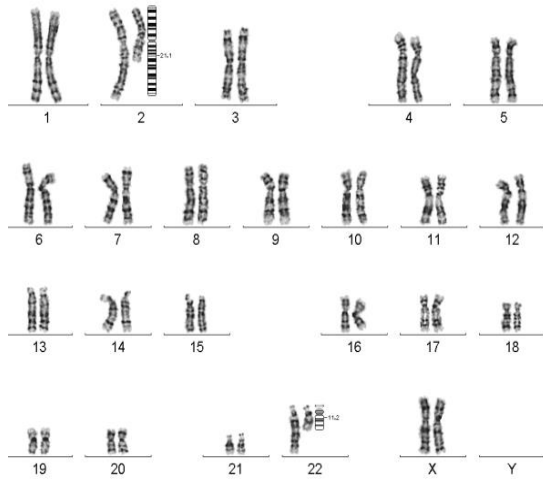


Рис. 6. Каріотип матері, 46,XX,t(2;22)(q21;q11.2)

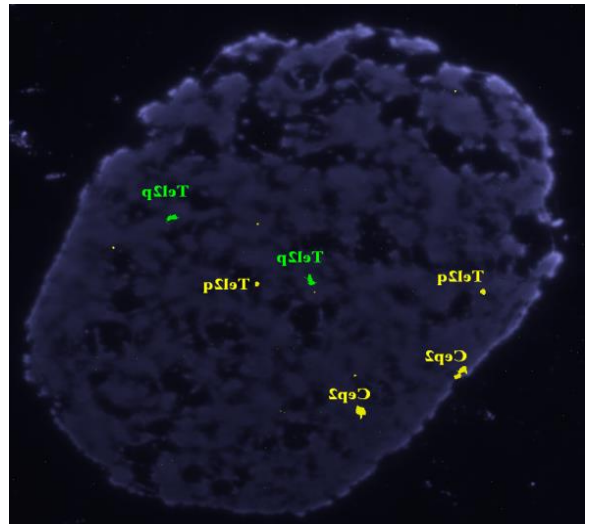


Рис. 7. Бластомер ембріона, раунд 1, зонди для варіанту хромосоми 2: CEP 2, Tel 2p, Tel2q

Зонди (рис. 7) у бластомері ембріона вказують на збалансованість ділянок хромосоми 2, залучених у транслокацію. Зонди на рис. 8 – на збалансованість ділянок хромосом 2 і 22 у ембріона, залучених у транслокацію. Зонди хромосом рис. 9 вказують на їх нормальну кількість, стать ембріона – жіноча.

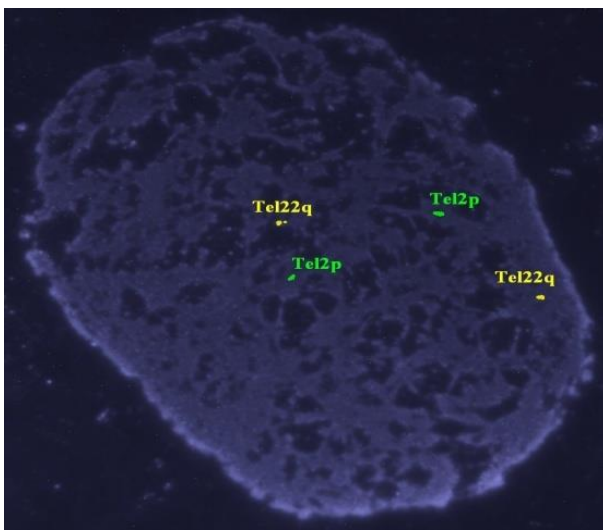


Рис. 8. Бластомер ембріона, раунд 2, зонди для хромосоми 2 та 22: Tel 2p, Tel22q

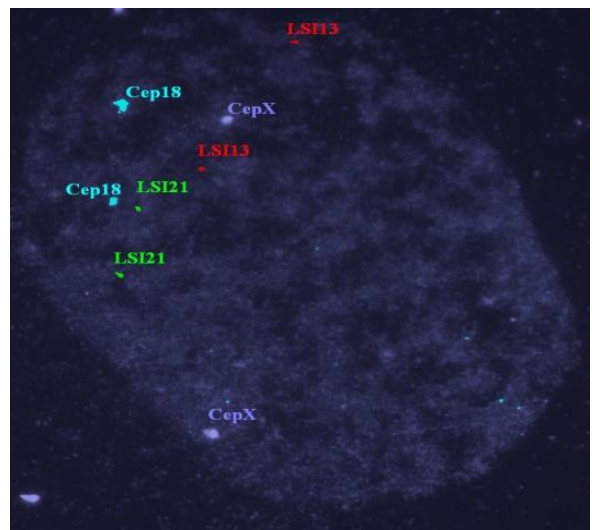


Рис. 9. Бластомер ембріона, раунд 3, зонди для виявлення найбільш частих анеуплоїдій 13, 18, 21,X,Y: LSI 13q34, CEP 18, LSI 21q21.2, CEPX, CEPY

Таким чином, при селекції ембріонів доцільним є аналіз з використанням кількох методів та видів біологічних зразків. Для родин з носійством транслокацій при ПГТ-СП – це застосування GTG-методу для підтвердження хромосомної перебудови батьків та подальше дослідження ембріонів методом NGS або методом FISH в кілька раундів для верифікації сегрегуючої транслокації.

Преімплантаційне генетичне тестування моногенних захворювань. Преімплантаційне генетичне тестування моногенних захворювань (ПГТ-М, PGT-M – preimplantation genetic testing for monogenic / single gene diseases) засноване на тестуванні ооцитів або бластомерів для відбору та перенесення в порожнину матки пацієнток генетично нормальних ембріонів.

Характеристики сімей з моногенними патологіями, які звертаються до ПГТ-М. Дослідження сімей з моногенними хворобами, для яких необхідне ПГТ-М, показало, що аутосомно-домінантні патології склали 39,4% (n=89), аутосомно-рецесивні – 43,8% (n=99) і Х-зчеплені – 16,8% (n=38) в структурі зазначеної генетичної патології. Частка пацієнтів з аутосомно-домінантними хворобами склала 29,1% (n=472), з аутосомно-рецесивними – 49,5 (n=803), з Х-зчепленими – 21,4% (n=346) серед обстежених осіб. Хворим або носієм мутації є представники обох статей, аргументом для проведення ПГТ-М є наявність хворих дітей або інших родичів близьких ступенів спорідненості.

Аналіз показав, що після ПГТ-М та трансферу 4419 нормальних ембріонів в 2396 (80,3%) циклах (1,84 ембріона на трансфер), відзначено розвиток 1905 (45,7%) вагітностей і народження 1118 дітей без моногенної патології і 47 здорових вагітностей, які тривали на момент обліку даних. Згідно результатів, показник народження здорових дітей на одного пацієнта становив 0,3-0,9, що є зіставним для різних захворювань ($p = 0,999$). Встановлено зворотний зв'язок між кількістю перенесених ембріонів і народжених здорових дітей, які припадають на пацієнта ($r=-0,49$, $p=0,022$), що свідчить на користь практики перенесення одного ембріона.

Вік батьків з родин груп ризику моногенних патологій та комбіноване ПГТ-М і ПГТ-А. Особливістю сімей, які планують ПГТ-М, може бути пізній репродукційний вік пари, > 36 років, що є важливим аргументом одночасного проведення ПГТ-М та ПГТ-А.

В осіб з 83 родин з генетичним ризиком моногенних патологій під час ПГТ-М та ПГТ-А було досліджено 1054 ембріона, з яких 320 – за допомогою біопсії клітин трофктодерми бластоцисти, 670 – біопсії бластомера і 64 – шляхом комбінованої біопсії полярного тільця і біопсії клітин трофктодерми бластоцисти.

Анеуплоїдію було встановлено у 41,2% (n=434) досліджених ембріонів. Ембріони, придатні для трансферу, були перенесені без заморожування в 41 з 92 циклів, виконаних за допомогою біопсії полярного тільця і бластомера, що призвело до 21 (51,2%) клінічної вагітності та народження 24 здорових дітей. 51 ембріон був перенесений в кріоциклі, що призвело до 40 (78,4%) клінічних вагітностей і народження 45 здорових дітей. Результативність тестування для виключення анеуплоїдії і генних мутацій можна оцінити за допомогою показника клінічної вагітності, якій склав 66,3% (n=61), що є підвищенням репродукційних показників у осіб з груп ризику моногенних патологій у критичному репродукційному віці.

Термін розвитку ембріонів та комбіноване ПГТ-М і ПГТ-А. Аналіз результатів одночасного проведення ПГТ-М і ПГТ-А з використанням різних біологічних зразків показав (табл. 2), що при дослідженні клітин трофктодерми на одного пацієнта припадає в три рази менше ембріонів як досліджених всього (1 : 6,5), так і придатних до переносу (1 : 2,7), у порівнянні з дослідженням бластомерів (1 : 21,6 і 1 : 8,7) або бластомерів і полярних тілець (1 : 21,3 і 1 : 10, 7) ($p < 0,05$).

**Аналіз результатів ПГТ-М і ПГТ-А,
виконаних на різних біологічних зразках**

Тип клітин	Кількість, n (%)						
	Пацієнтів	Циклів	Ембріонів тестованих	Ембріонів, придатних до трансферу	Ембріонів до трансферу	Вагітностей	Народжень
Т	49	78	320	134	78	40	38
Б	31	53	670	268	56	20	18
ПТ та Б	3	7	64	32	5	1	1
Усього	83	138	1054	434	139	61	57

Примітка: Т – трофктодерма; Б – бластомер; ПТ – полярне тільце.

У той же час співвідношення кількості перенесених ембріонів, отриманих здорових вагітностей і народжених дітей до одного пацієнта при виконанні досліджень при всіх трьох підходах зівставні і не мають значущої різниці ($p > 0,05$). Співвідношення кількості пацієнтів з доміантними і рецесивними патологіями в сім'ях в перших двох групах також є зівставним (табл. 2). Таким чином, при ПГТ-М і ПГТ-А дослідження ембріонів на п'яту добу є більш доцільним, оскільки дозволяє отримати зівставні з результатами аналізу ембріонів на третю добу розвитку показники народження здорових дітей, але за менших часових, економічних і репродукційних навантажень.

HLA-типування як фактор тестування анеуплоїдії під час ПГТ-М. Необхідність HLA-типування ембріона є важливою процедурою для сімей, які мають дітей з патологіями, що потребують аlogenної трансплантації кісткового мозку. Аналіз результатів засвідчив, що в результаті ПГТ-М з проведенням HLA-типування у 6% ембріонів виявлено анеуплоїдію хромосоми 6, яка впливає на кінцевий результат HLA-типування, тому для таких родин доцільне супутнє тестування на анеуплоїдію. Додатковим аргументом на користь останнього може бути підвищений репродукційний вік потенційних батьків, > 36 років. HLA-типування при ПГТ-М було проведено в сім'ях з 23 моногенними патологіями, найчастіше з гемоглобінпатіями, таласемією і серповидно-клітинною анемією. Після перенесення 351 HLA-типованого нормального ембріона було отримано 72 клінічних вагітності та народилось 59 HLA-ідентичних сибсам дітей. За нашими даними, при ПГТ-М з проведенням HLA-типування, показник настання вагітності у 151 пари без тестування на анеуплоїдію склав 23%. Дослідження з тестуванням анеуплоїдії, виконане для 91 пари, дозволило отримати здорову вагітність в 40% випадків ($p < 0,01$). Таким чином, ПГТ-М з HLA-типуванням та ПГТ-А дає можливість народження здорового HLA-ідентичного донора для лікування вроджених і набутих порушень кісткового мозку.

ПГТ генетичних захворювань, обумовлених мутаціями *de novo*. ПГТ-М доцільно для родин без обтяженого сімейного анамнезу або з вперше визначеною генетичною патологією у одного з подружжя чи у хворої дитини, в разі виявлення мутації *de novo* в гонадах батьків, коли не можуть бути використані традиційні

підходи до ПГТ-М. Аналіз даних щодо ПГТ-М у 152 родин з патологіями, пов'язаними з мутаціями *de novo*, показав, що 88,2% (n=134) порушень визначалися домінантними, 4,0% (n=6) – рецесивними і 7,8% (n=12) – Х-зчепленими мутаціями. У сім'ях з домінантними мутаціями 51,5% (n=69) мали батьківське походження, 42,5% (n=57) – материнське і 6,0% (n=8) були виявлені вперше тільки у хворих дітей. Розробка підходів до ПГТ щодо мутацій *de novo* залежала від їх походження, тому необхідним було проведення аналізу ДНК батьків і хворих дітей для визначення мутації і поліморфних маркерів за допомогою тестування різних біологічних зразків, що забезпечувало інформацію про нормальні і мутантні гаплотипи для відстеження мутації. Аналіз показав, що відношення показників кількості лікувальних циклів, ембріонів, трансферів, вагітностей і народжених дітей, що припадають на одну особу, зіставні для обох статей як при домінантних, так і при рецесивних мутаціях *de novo* (табл. 3).

Таблиця 3

Аналіз результатів ПГТ-М в сім'ях з моногенними патологіями, обумовленими мутаціями *de novo* різного походження

Тип успадкування	Походження мутації	Кількість, n						P
		Осіб в ПГТ-М	Циклів	Ембріонів, придатних до трансферу	Трансферів	Вагітностей	Народжень	
АД (N=35)	Жін	18	38	53	31	13	14	0,999
	Чол	31	62	86	53	29	33	
АР (N=4)	Жін	1	2	4	2	1	0	0,830
	Чол	3	6	7	6	4	3	
Хзч (N=3)	Жін	7	13	16	10	5	5	-

Примітка: N, n – кількість патологій; Жін – жіноча стать; Чол – чоловіча стать; АД – аутосомно-домінантний тип успадкування; АР – аутосомно-рецесивний тип успадкування; Хзч – зчеплений зі статтю тип успадкування; P – рівень значущості.

Не відмічено значущої різниці між зазначеними співвідношеннями для жінок з домінантними та рецесивними мутаціями ($p=0,376$) і для чоловіків ($p=0,998$). Таким чином, різні методики при дослідженні різних біологічних зразків дають зіставні показники генетичного статусу ембріонів і народжених здорових дітей, що підтверджується отриманими результатами – часткою визначених нормальних ембріонів для перенесення (86%), перенесенням ембріонів без мутації *de novo* (в середньому 1,7 ембріона на трансфер), розвитком 49,8% вагітностей і народженням дітей без патологій. Також ПГТ-М для мутацій *de novo* дозволяє родинам з групи ризику уникнути проблеми низької поінформованості щодо сімейного анамнезу, традиційних вимог до генеалогічного аналізу та урахувати обмеження щодо тестування видів зразків.

Оптимізація преімплантаційного генетичного тестування для попередження моногенної патології. Від особливостей родини та мети ПГТ-М

залежить вибір підходів щодо отримання та дослідження біологічного зразка – окремих бластомерів, або клітин з бластоцист, або жіночих гамет шляхом генетичного аналізу першого і другого полярних тілець, та методів молекулярно-генетичного/цитогенетичного аналізу.

Походження мутації та створення алгоритму ПГТ-М. В залежності від походження мутації, віку пацієнтів та мети дослідження можливе використання стратегій комбінованого тестування мутацій, анеуплоїдії і HLA.

Наведені алгоритми (рис.10, 11, 12, 13) з можливістю комбінування ПГТ-А та ПГТ-М доцільно використовувати при будь-яких генетичних порушеннях.

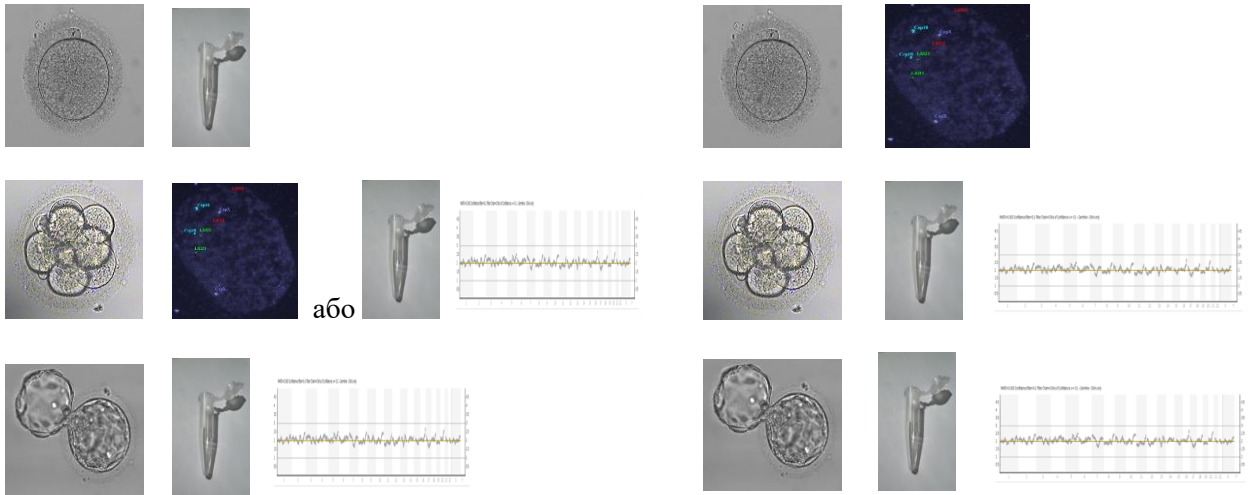


Рис. 10. Материнське походження мутації, тестування домінантної мутації або Х-зчепленої і анеуплоїдії

Рис. 11. Батькове походження мутації, тестування домінантної мутації і анеуплоїдії

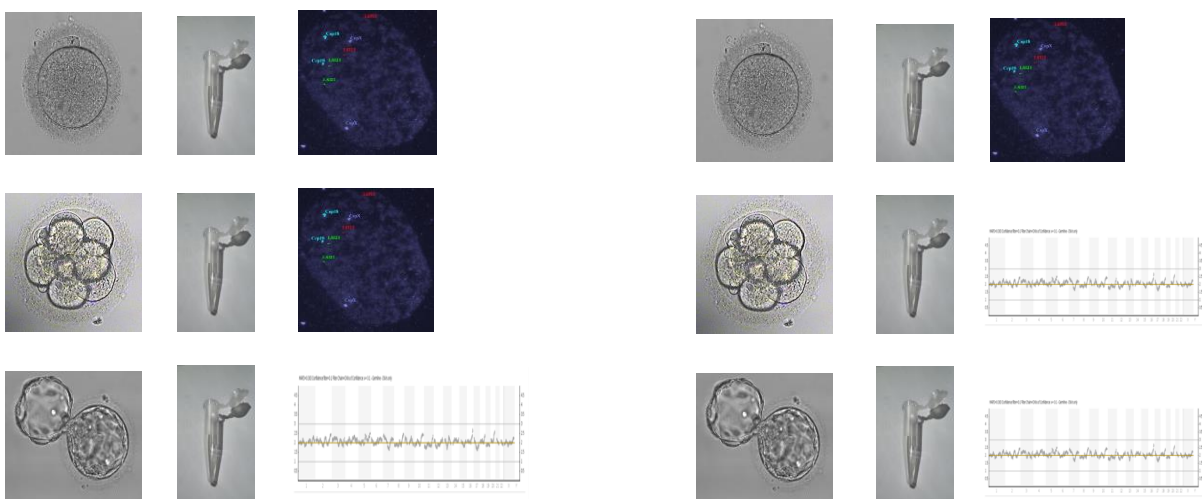


Рис. 12. Тестування рецесивних патологій і анеуплоїдій

Рис. 13. Тестування мутації, анеуплоїдії і HLA-типування

Приклади визначення мутацій при ПГТ-М. Визначення підходів ПГТ щодо мутацій *de novo* залежить від їх походження, і, отже, аналіз ДНК батьків і хворих дітей до ПГТ-М необхідний для визначення мутації і поліморфних маркерів за допомогою тестування окремих сперматозоїдів і аналізу полярних тілець ооцитів, для ідентифікації нормальних і мутантних гаплотипів для відстеження мутації.

Як приклад можна розглянути сім'ю, для якої проведено ПГТ-М для визначення мутації *de novo* – делеції інтрона 27-38 в гені *NF1* материнського походження (рис.14).

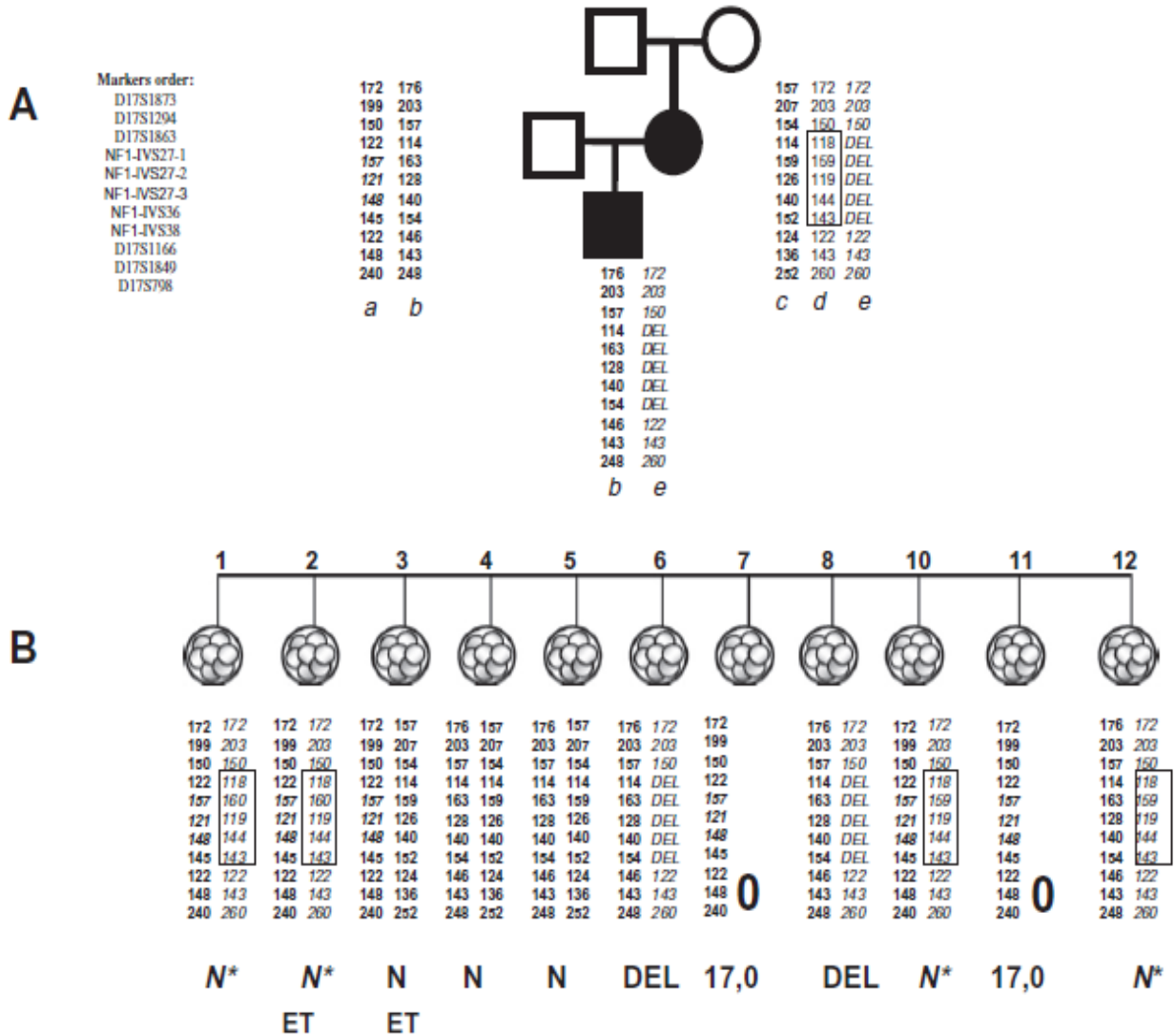


Рис. 14. Алгоритм ПГТ-М на прикладі родини з мутацією *de novo* в гені *NF1*

На рис.14, А представлено родовід сім'ї з хворим сином, у якого виявлено делецію інтрона 27-38 в гені *NF1*. Делеція не розпізнається в материнській ДНК, яку виділено із зразків крові, хоча встановлені два гаплотипи (с і d) і останній відповідає мутантному гаплотипу у хворого сина, але без делеції. Показана «очікувана» делеція в нормальній хромосомі, представлений материнський гаплотип, такий, як у хворого сина, але без делеції. Фактичний мутантний гаплотип (e) з делецією виявлений в

одиночних лімфоцитах матері. Нормальні батьківські гаплотипи (а) і (б) встановлені за допомогою маркерів, один з них виявлено у нормальній хромосомі сина.

На рис.14, В наведено результати циклу ПГТ-М, виконаного методом мультиплексної напівгніздової ПЛР на бластомерах з 11 ембріонів. Ембріони 3, 4, 5 визначені як нормальні (N) із материнським нормальним гаплотипом (с) і рекомендовані для перенесення. Чотири ембріона 1, 2, 10 і 12, які успадкували «доброякісний» мутантний материнський гаплотип (d), також прогнозувалися як нормальні (N*) і могли бути рекомендовані для перенесення. Ембріони 7 і 11 мали моносомію за хромосомою 17, встановлену за відсутності материнських алелів. Ембріони 6 і 8 мали делецію, про що свідчила відсутність материнських маркерів в області делеції, DEL. Саме ембріони 2 і 3 були перенесені, результатом стала здорова вагітність.

Таким чином, підходи дослідження можуть відрізнятися в залежності від типу успадкування мутації, статі носія, мутації *de novo*, можливості тестування різних біологічних зразків у зв'язку з юридичними або релігійними обмеженнями, але загальний підхід включає ідентифікацію походження мутації *de novo*, пошук можливого гонадного мозаїцизму і відповідних батьківських гаплотипів.

ВИСНОВКИ

У дисертації визначені молекулярно-генетичні/цитогенетичні характеристики осіб з родин, які найчастіше потребують лікування методами допоміжних репродукційних технологій та оптимізації преімплантаційного генетичного тестування анеуплоїдій/структурних перебудов і моногенних патологій з урахуванням цих характеристик.

1. Встановлено, що на п'яту добу розвитку характер розподілу ембріонів в залежності від категорії зигот значуще відрізнявся як від рівномірного, так і від показників третьої доби. Найбільшу кількість ембріонів отримано із зигот категорій Z1 і Z2, для яких відзначено найбільшу частку морфологічно якісних бластоцист градації AA – 69,0% і 60,9%.

2. Дослідження розподілу показників залученості хромосом різних груп в реципрокні транслокації батьків показало, що найбільшу частку ембріонів було отримано від батьків із транслокаціями хромосом груп А та С – 37,0% та 22,5% від усіх тестованих, а найбільшу частку еуплоїдних ембріонів зі збалансованими хромосомними наборами – від батьків із транслокаціями хромосом груп В та D – 21,4 та 18,2%, відповідно.

3. Відмічено різницю у співвідношенні ембріонів зі збалансованими та незбалансованими транслокаціями між матерями та батьками носіями траслокацій. Від матерів-носіїв їх отримано у відношенні 1 : 2,8, від батьків – 1 : 4,3. Доведено, що серед осіб, носіїв транслокацій, від яких були отримані і проаналізовані п'ятидобові ембріони, співвідношення чоловіків і жінок склало 3 : 1. Частота вагітностей, які успішно розвивалися, була вище майже в півтора рази в групах, де носієм транслокації був чоловік.

4. Показано зниження показників – кількості отриманих ембріонів ($r = -0,48$), числа еуплоїдних ембріонів, як зі збалансованим хромосомним набором ($r = -0,68$), так із незбалансованим ($r = -0,60$), із підвищенням віку батьків.

5. Оцінено результати ПГТ-А/СП клітин трофектодерми п'ятидобових ембріонів шляхом NGS та FISH. З 64,3% зразків з однаковими генетичними характеристики за обома методами, 45,7% мали еуплоїдний набір хромосом, 18,6% – анеуплоїдний. Загальний зіставний результат – хромосомні аномалії або нормальний хромосомний набір, при застосуванні двох методів отримано для 78,6% ембріонів.

6. Визначено анеуплоїдію хромосоми 6 у 6,0 % ембріонів у родинах із моногенними патологіями, що потребують ПГТ-М з НLA-типуюванням.

7. Показано, що при ПГТ-М і ПГТ-А дослідження ембріонів на п'яту добу розвитку дозволяє отримати зіставні з результатами аналізу ембріонів на третю добу розвитку показники кількості перенесених ембріонів (1,6 у порівнянні з 1,8 на особу) та народження здорових дітей (1,3 у порівнянні з 1,7 на особу) за менших часових, економічних і репродукційних навантажень.

8. Відмічено, що за умов пізнього репродукційного віку батьків (> 36 років) анеуплоїдний набір хромосом було визначено у 41,2% ембріонів у програмах ПГТ-М. Показник живонароджень після одночасного проведення ПГТ-М та ПГТ-А склав 66,3%.

9. Доведено, що при ПГТ моногенних захворювань, зумовлених мутаціями *de novo*, дослідження різних біологічних зразків батьків обох статей для оцінки мутації дають зіставний репродукційний результат – на рівні 49,8% здорових вагітностей і народження тільки здорових дітей.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Дослідження ембріонів – молекулярно-генетичне/цитогенетичне та морфологічне доцільно проводити на п'яту добу їх розвитку, коли можливість відбору життєздатних ембріонів вища.

2. При плануванні ПГТ-А/СП у родинах із реципрокними транслокаціями хромосом доцільно врахувати статево-вікові особливості батьків, оскільки частота вагітностей, які успішно розвиваються, вища в групах, де носієм транслокації є чоловік.

3. При плануванні ПГТ-А/СП у родинах із реципрокними транслокаціями хромосом доцільно врахувати, що з віком батьків кількість отриманих ембріонів, і загальна, і зі збалансованим хромосомним набором, знижується.

4. При плануванні ПГТ-А/СП у родинах із реципрокними транслокаціями хромосом доцільно врахувати, що найвищі значення отримання ембріонів з еуплоїдним та збалансованим набором хромосом відмічено для батьків із транслокаціями хромосом груп В і D та у групі носіїв транслокацій за участю метацентричних-ахроцентричних хромосом.

5. Для родин з носійством транслокацій для визначення структурних перебудов хромосом під час ПГТ доцільно застосування методу NGS або FISH в

кілька раундів для верифікації сегрегуючої транслокації з попереднім використанням GTG-методу для визначення хромосомної перебудови батьків.

6. При плануванні ПГТ-М для родин з груп ризику щодо розвитку моногенних патологій можливо врахувати, що тип їх успадкування не впливає на показник народження здорових дітей, який складає 0,3-0,9 на одного пацієнта, і є зіставним для різних захворювань.

7. При плануванні ПГТ-М пізній репродукційний вік пари (> 36 років) є підставою проведення ПГТ-А, оскільки можлива наявність надлишкової або однієї хромосоми з пари, яка включає мутацію, створює додаткові ризики народження хворої дитини.

8. У родинях з хворими на патології, що потребують аlogenної трансплантації кісткового мозку, HLA-типування доцільно проводити під час ПГТ-М та ПГТ-А для можливості народження здорового HLA-ідентичного донора.

9. При плануванні ПГТ-М у родинях з мутаціями *de novo* доцільно врахувати тип успадкування мутації, стать носія мутації *de novo*, вік потенційних батьків, побажання родини щодо можливості тестування різних біологічних зразків у зв'язку з релігійними та юридичними обмеженнями.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. **Верлинский О. Ю.**, Гонтарь Ю. В., Казачкова Н. И., Лахно Я. В., Ильин И. Е., Федота А. М. Анализ генетических характеристик эмбрионов и методологии исследования транслокаций у человека. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2020. Т 27. С. 190–195. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v27.1325> (Дисертант брав участь у розробці методології дослідження, інтерпретації результатів, підготовці статті до публікації).
2. Plyin I.E., Nikitin O. D., Gontar J. V., Buderatska N. O., **Verlinsky O. Y.** Application of the Pronuclear Scoring System for Predicting the Morphology and Ploidy of Early Human Embryos. *Cytology and Genetics*. 2019. Vol. 53, No. 3. P. 227–232. DOI: 10.3103/S0095452719030071 (Дисертант брав участь у розробці методології дослідження, інтерпретації результатів).
3. Isaev A.A., Deev R.V., Kuliev A., Plaxa I. L., Stancheva N. V., Borovkova A. S., Potapov I. V., Pomerantseva E. A., Chogovadze A. G., Boyarsky K. Y., Semenenko A. E., Mikhailov A. V., Shevchenko K. G., Prikhodko A. V., Rechitsky S., Paina O. V., Barchatov I. M., Zubarovskaya L. S., **Verlinsky O.**, Bozo I. Y., Afanasyev B. V. First experience of hematopoietic stem cell transplantation treatment of Shwachman–Diamond syndrome using unaffected HLA–matched sibling donor produced through preimplantation HLA typing. *Bone Marrow Transplantation*. 2017. Vol. 52, No. 9. P. 1249–1252. <https://doi.org/10.1038/bmt.2017.46> (Дисертант брав участь у розробці методології дослідження, проведенні досліджень, інтерпретації результатів).
4. Гонтарь Ю. В., **Верлинский О. Ю.**, Кирпий А., Ильин И. Е., Федота А. М. Сравнение NGS и FISH технологий: комплексный скрининг 24 хромосом

эмбрионов. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017. Т. 21. С. 311–315. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEEO.v21.858> (Дисертант брав участь у розробці методології дослідження, інтерпретації результатів, підготовці статті до публікації).

5. Гонтарь Ю. В., **Верлинский О. Ю.**, Ильин И. Е., Федота А. М. Исследование анеуплоидии и полиплоидии у человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2016. Т. 14, № 1. С. 8–15. DOI: <https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.14.1.539> (Дисертант брав участь у розробці методології дослідження, інтерпретації результатів, підготовці матеріалів до публікації).
6. Rechitsky S., **Verlinsky O.**, Kuliev A. PGD for cystic fibrosis patients and couples at risk of an additional genetic disorder combined with 24-chromosome aneuploidy testing. *Reproductive Biomedicine Online*. 2013. Vol. 26, No. 5. P. 420–430. DOI: [10.1016/j.rbmo.2013.01.006](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.01.006) (Дисертант брав участь у розробці методології дослідження, проведенні досліджень, інтерпретації результатів, підготовці статті до публікації).
7. **Верлинский О.** Влияние кроссинговера на распределение генов бета-глобина между полярными тельцами и ооцитом и клинические испытания предимплантационной генетической диагностики с использованием анализа полярных теллец. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія*. 2011. Вип. 14, № 971, С. 77–81.
8. Rechitsky S., Pomerantseva E., Pakhalchuk T., Pauling D., **Verlinsky O.**, Kuliev A. First systematic experience of preimplantation genetic diagnosis for de-novo mutations. *Reproductive Biomedicine Online*. 2011. Vol. 22, No. 4. P. 350–361. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.01.005> (Дисертант брав участь у розробці методології дослідження, проведенні досліджень, інтерпретації результатів, підготовці статті до публікації).

Монографія:

9. Kuliev A., Rechitsky S., **Verlinsky O.** Atlas of Preimplantation Genetic Diagnosis. CRC Press, 2014. 328 p. (Дисертант брав участь у розробці методологій досліджень, проведенні досліджень, інтерпретації результатів, підготовці монографії до друку).

Тези:

10. **Верлінський О. Ю.**, Гонтар Ю. В., Ільїн І. Є., Федота О. М. Аналіз результатів застосування FISH та NGS технологій при оцінці цитогенетичних ознак людини. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців, яка присвячена 215-річчю заснування медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, Харків, 26–27 бер. 2020 р. Х. : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2020. С. 58.*

11. **Верлінський О. Ю.**, Гонтар Ю. В., Казачкова Н. І., Лахно Я. В., Ільїн І. Є., Федота О. М. Дослідження робертсонівських та реципрокних траслокацій людини у програмах допоміжних репродукційних технологій. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців, яка присвячена 215-річчю заснування медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.* Харків, 26–27 бер. 2020 р. Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2020. С. 59.
12. Гонтар Ю. В., Ярошик М. І., **Верлінський О. Ю.**, Будерацька Н. О., Ільїна К. І., Казачкова Н. І., Лавриненко С. В., Ришкова Н. В., Лахно Я. В. Порівняння еуплоїдності ембріонів, отриманих зі свіжих ооцитів та ооцитів після вітрифікації. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XVI міжнародної науково-практичної конференції, Харків, 28–29 бер. 2019 р.* Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2019. С. 74–75.
13. Будерацька Н. О., Гонтар Ю. В., Лавриненко С. В., **Верлінський О. Ю.**, Ярошик М. І., Ільїна К. І., Лахно Я. В. Вплив морфології та локалізації мейотичного веретена ооцитів людини на якість та еуплоїдність отриманих ембріонів. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XV Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців, Харків, 25–26 квіт. 2018 р.* Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2018. С. 49–51.
14. Гонтар Ю. В., **Верлінський О. Ю.**, Ярошик М. І., Будерацька Н. О., Лавриненко С. В., Ільїна К. І., Казачкова Н. І., Лахно Я. В. Оцінка пронуклеусів для прогнозу еуплоїдності ембріонів донорів та пацієнтів зі зниженням фертильності. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XV Міжнародна наукова конференція студентів, молодих вчених та фахівців, Харків 25–26 квіт. 2018 р.* Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2018. С. 72–73.
15. **Верлінський О. Ю.**, Гонтар Ю. В., Будерацька Н. О., Лавриненко С. В., Парницька О. І., Ільїна Є. І., Капустін Е. В. Вплив технології донації цитоплазми на еуплоїдність ранніх ембріонів. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців, Харків, 30–31 бер. 2017 р. : у 2-х томах. X. : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2017. Т. 2. С. 74–76.*
16. Будерацька Н. А., Гонтар Ю. В., Лавриненко С. В., Парницька О. І., **Верлінський О. Ю.**, Ільїна Є. І., Капустін Е. В. Доїмплантаційна діагностика ембріонів, що отримані з вітрифікованих ооцитів. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців, Харків, 30–31 бер. 2017 р.* Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2017. Т. 2. С. 71–74.
17. **Верлінський О. Ю.**, Гонтар Ю. В., Ільїн І. Є., Федота О. М. Біоетичні аспекти допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). *Біоетика та біобезпека: Мультидисциплінарні аспекти: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 105-річчю пам'яті В.К. Високовича, 23-24 травня 2017 р. – Харків, 2017. С. 40–41.*

АНОТАЦІЯ

Верлінський О.Ю. Родинно-специфічний дизайн попередження моногенної та хромосомної патології людини у доімплантаційний період. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика. – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2021.

У дисертації визначені молекулярно-генетичні/цитогенетичні характеристики для осіб з родин, які найчастіше потребують лікування методами допоміжних репродукційних технологій та оптимізації преімплантаційного генетичного тестування анеуплоїдій/структурних перебудов і моногенних патологій з урахуванням цих характеристик.

Під час досліджень використано первинну облікову інформацію пацієнтів, медичну документацію, зразки біологічного матеріалу: венозну кров, еякулят, полярні тільця ооцитів, бластомери ембріонів на стадії 8-ми бластомерів, клітини трофктодерми ембріонів на стадії бластоцисти, рідину бластоцелі ембріонів на стадії експандованої бластоцисти. Застосовано такі методи молекулярно-генетичного/цитогенетичного аналізу як секвенування нового покоління (next generation sequencing, NGS), ПЛР, флуоресцентну гібридизацію *in situ* (fluorescence in situ hybridization, FISH), GTG метод.

Результати показали, що преімплантаційне генетичне тестування ембріонів доцільно проводити на п'яту добу їх розвитку *in vitro*. Найбільшу частку ембріонів було отримано від батьків із транслокаціями хромосом груп А та С – 37,0% та 22,5% від усіх тестованих, а найбільшу частку еуплоїдних ембріонів зі збалансованими хромосомними наборами – від батьків із транслокаціями хромосом груп В та D – 21,4 та 18,2% відповідно. Встановлено різницю між матерями та батьками-носіями транслокацій у співвідношенні ембріонів зі збалансованими та незбалансованими транслокаціями. Серед осіб, носіїв транслокацій, від яких були отримані і проаналізовані п'ятидобові ембріони, співвідношення чоловіків і жінок склало 3 : 1, а частота вагітностей, які успішно розвивалися, була вище майже в півтора рази в групах, де носієм транслокації був чоловік. Визначено, що співставні результати при застосуванні методів NGS та FISH для оцінки хромосомного набору отримано для 78,6 % ембріонів на п'яту добу розвитку. Встановлено анеуплоїдію хромосоми 6 у 6,0 % ембріонів у родинях із моногенними патологіями, які потребують ПГТ-М з HLA-типуванням, що впливатиме на кінцевий результат HLA-типування за відсутності ПГТ-А. Показано, що HLA-типування під час преімплантаційного генетичного тестування генних мутацій та анеуплоїдій уможливує народження здорового HLA-ідентичного донора для лікування осіб з патологіями, що потребують аlogenної трансплантації кісткового мозку. Доведено негативний зв'язок між віком батьків та кількістю ембріонів з еуплоїдним набором хромосом, тому застосування ПГТ-А під час ПГТ-М підвищує результативність ДРТ

до 66,3%. Доведено, що при ПГТ моногенних захворювань, обумовлених мутаціями *de novo*, дослідження різних біологічних зразків від батьків обох статей для оцінки мутації дають зіставний репродукційний результат – на рівні 49,8% здорових вагітностей і народження тільки здорових дітей.

Ключові слова: ембріон, реципрокні транслокації, моногенні патології, ПГТ-А/СП, ПГТ-М, ДРТ

SUMMARY

Verlinsky O. Y. Family-specific preimplantation genetic testing for the prevention of monogenic and chromosomal pathology in humans. – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences, specialty 03.00.22 – molecular genetics. – V.N. Karazin Kharkiv National University. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The dissertation identifies molecular genetic / cytogenetic characteristics of individuals from families that most often need assisted reproductive technologies (ART) and optimization of preimplantation genetic testing of aneuploidies / structural changes (PGT-A / SR) and monogenic pathologies (PGT-M) taking into account these characteristics.

The most common and international category of patients treated with ART using preimplantation genetic testing (PGT) are individuals from families with monogenic disorders and specific chromosomal abnormalities, in particular, balanced chromosome translocations. During the work the primary registration information of patients, medical documentation, samples of biological material: venous blood, semen, polar bodies of oocytes, blastomeres of embryos at the stage of 8 blastomeres, cells of embryonic trophoblast at the stage of blastocyst, embryonic blastocyst fluid at the stage of expanded blastocyst were used. To perform the research such methods of genetic analysis as next generation sequencing (NGS), PCR, *in situ* fluorescence hybridization (FISH), and GTG method were applied.

The results showed that preimplantation genetic testing of embryos should be performed on the fifth day of their development *in vitro*. The largest share of embryos was obtained from parents with translocations of chromosomes A and C groups – 37.0% and 22.5% of all tested, and the largest share of euploid embryos with balanced chromosome sets – from parents with translocations of chromosomes B and D groups – 21 – 4-18.2%, respectively. The difference between mothers and fathers carrying translocations in the ratio of embryos with balanced and unbalanced translocations was established. Among the individuals from whom five-day-old embryos were obtained and analyzed, the male-to-female ratio was 3 : 1, and the incidence of successful pregnancies was almost one and a half times higher in the male translocation groups. It was found that comparable results after using NGS and FISH methods to assess chromosome set were obtained for 78.6% of embryos on the fifth day of development. Aneuploidy of chromosome 6 was found in

6.0% of embryos in families with monogenic pathologies requiring PGT-M with HLA-typing, which will affect the final result of HLA-typing in the absence of PGT-A. It has been shown that HLA-typing during preimplantation genetic testing of gene mutations and aneuploidies allows the birth of a healthy HLA-identical donor for the treatment of individuals with pathologies requiring allogeneic bone marrow transplantation. A negative relation between parental age and the number of embryos with a euploid set of chromosomes has been proven, so the using of PGT-A during PGT-M increases the effectiveness of ART to 66.3%. It is proved that in PGT of monogenic diseases caused by *de novo* mutations, studies of different biological samples from parents of both sexes to assess the mutation give a comparable reproductive result - at 49.8% of healthy pregnancies and the birth of only healthy children.

Key words: embryo, reciprocal translocations, monogenic pathologies, PGT-A / SP, PGT-M, ART