

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В. Н. КАРАЗІНА
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА
ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ВЕРЛІНСЬКИЙ ОЛЕГ ЮРІЙОВИЧ

УДК 577.21:57.088.7:618.177-089.888.11

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.22 — молекулярна генетика

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О. Ю. Верлінський

Науковий керівник: Федота Олена Михайлівна,
доктор біологічних наук, професор

Харків — 2021

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 наведено теоретичне узагальнення та вирішення наукового завдання, яке полягає у визначенні генетичних характеристик родин, що найчастіше потребують допоміжних репродукційних технологій (ДРТ), оптимізації преімплантаційного генетичного тестування анеуплоїдій/структурних перебудов (ПГТ-А/СП) та преімплантаційного генетичного тестування моногенних патологій (ПГТ-М) з урахуванням їхніх особливостей.

Відомо, що на даний час народження здорових нащадків у родинах із порушеннями репродукційної функції та генетичними захворюваннями можливо завдяки розвитку ДРТ. У популяційному аспекті ослаблення тиску відбору проти окремих генотипів чи каріотипів призведе до підвищення їхньої поширеності серед населення, яке, як наслідок, матиме «генетичний тягар», додаткове економічне та соціальне навантаження. З іншого боку, дослідження механізмів виникнення та розвитку генетичних порушень та нагромадження нових даних дає можливість розширити уявлення щодо фундаментальні основи життя, розуміння процесів розвитку організму на різних етапах.

Для окремих родин можливості ДРТ сприяють народженню здорових дітей, тому, у межах цього напрямку, доцільною є оптимізація підходів до

генетичних досліджень у сім'ях із урахуванням їхніх біологічних і соціальних особливостей. Унікальні потреби окремих пацієнтів, відмінності в місцевих або національних правилах і лабораторних методах можуть зумовлювати різницю в способах практики преімплантаційного генетичного тестування (ПГТ) від первісного наряду до лікування шляхом запліднення *in vitro* (ЗІВ) і генетичного тестування, подальшого спостереження за вагітністю, пологами та дітьми. Оскільки в межах діючого законодавства правила та умови можуть варіювати між країнами та медичними центрами, відповідно до особливостей та потреб родин пацієнтів доцільно формувати власні підходи ПГТ для підвищення результативності ДРТ.

Метою дослідження було визначення генетичних особливостей батьків-носіїв хромосомних і генних мутацій та їхніх ембріонів та оптимізація преімплантаційного генетичного тестування анеуплоїдій/структурних перебудов (ПГТ-А/СП) та моногенних порушень (ПГТ-М).

Під час дослідження використано первинну інформацію про пацієнтів, медичну документацію, зразки біологічного матеріалу: венозну кров, еякулят, полярні тільця, бластомери, трофектодерму, рідину бластоцелі бластоцист. Проведено ретроспективний аналіз бази даних щодо 69 носіїв транслокацій і 193 їхніх ембріонів, та аналіз даних 291 носія транслокацій у програмах ПГТ-А/СП з родин, які мали репродукційні порушення, а саме безпліддя, завмерлі вагітності, невиношування вагітності, спонтанні аборти, азооспермію та інші. Для порівняння результативності застосування технологій у ПГТ-А/СП було проаналізовано дані щодо 70 ембріонів, оцінених молекулярно-цитогенетичними та молекулярно-генетичними методами одночасно, та дві групи ембріонів у кількості 287 і 365, генетичні характеристики яких було визначено різними методами. Для аналізу результатів ПГТ-М вивчено інформацію про 1 149 пацієнтів з родин з моногенними патологіями та 4 419 їхніх ембріонів. Матеріали щодо одночасного виконання ПГТ-М та ПГТ-А проаналізовано у 83 родин, 1 054 ембріонів. При ПГТ-М для дослідження мутацій *de novo* вивчено матеріали щодо 152 родин, 403 ембріонів. Під час оцінювання

морфологічних характеристик зигот для прогнозування потенціалу ембріона проаналізовано 352 ооцити.

Оцінювання зигот виконувалось за методом Z-оцінювання, визначення якісних характеристик ембріонів — за Гарднером. Каріотипи було визначено за стандартною методикою культивування лімфоцитів периферійної крові та приготування препаратів метафазних хромосом та інтерфазних ядер. Для оцінки цитогенетичних, молекулярно-цитогенетичних і молекулярних параметрів було залучено методи NGS та FISH. Створення баз даних і проведення статистичного аналізу виконувалось за допомогою пакета програм Microsoft Excel операційної системи Windows XP Professional 1–2 CPU (Microsoft, США), ліцензія № X08-73060. Для обробки зображень цитогенетичних препаратів застосовувалося програмне забезпечення компанії MetaSystems (ФРН), ліцензія № ISS-0299. Для досліджень стандартними методами цитогенетики використовувалася програма Ikaros, для молекулярно-цитогенетичних досліджень із застосуванням флуоресценції — програма Isis. Для обробки даних, отриманих за застосування секвенування нового покоління, первинні результати секвенування автоматично із апарату IonS5 надходили до хмарного інтернет-ресурсу ThermoFisherCloud, в якому виконувався аналіз даних і формування профілей ембріонів. Визначення наявності мутацій відбувалося з використанням додатку Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, США). Статистичний аналіз проведено з перевіркою розподілу кількісних дат на відповідність закону нормального розподілу методами Шапіро-Уїлка та Колмогорова-Смірнова. Порівняння середніх арифметичних здійснювалось за критерієм Стюдента. Різниця частот оцінених параметрів визначалась за допомогою ϕ перетворення Фішера шляхом кутовий трансформації. Під час проведення множинних порівнянь в окремих випадках вводилася поправка Бонферроні. Існування зв'язків між ознаками оцінювалося методом кореляційного аналізу за Пірсоном та Спірменом. Статистичні гіпотези перевірялись критеріями t і χ^2 .

За результатами дослідження встановлено, що на п'яту добу розвитку характер розподілу ембріонів залежно від категорії зигот значуще відрізнявся як від рівномірного, так і від показників на третю добу — найбільшу кількість ембріонів отримано із зигот категорій Z1 і Z2, для яких відзначено найбільшу кількість морфологічно якісних бластоцист градації AA — 69,0 % і 60,9 %. Таким чином, дослідження ембріонів доцільно проводити на п'яту добу розвитку, коли можливість відбору життєздатних ембріонів, які походять з зигот категорій Z1–Z3, вища, а ймовірність пошкодження ембріона нижча. Оцінка якості зиготи за морфологічними критеріями важлива не тільки для прогнозу розвитку ембріона, але й для планування типу протоколу стимуляції суперовуляції. Особливо це стосується родин, в яких можливість отримання ембріонів або їхня кількість та якість є обмеженими.

Визначено, що ембріони на п'яту добу розвитку зі збалансованими транслокаціями склали 20,7 % від усіх, отриманих від батьків з реципрокними транслокаціями, а ембріони з еуплоїдним та збалансованим хромосомним набором — 13,0 %. Оскільки літературні та власні показники ілюструють дію природного відбору на користь нормальних або збалансованих хромосомних наборів, доцільним є проведення преімплантаційного генетичного тестування щодо структурних перебудов на п'яту добу розвитку ембріона, тим більше, що саме на стадії бластоцисти ембріон потрапляє в матку у природному циклі.

Доведено, що серед осіб, від яких були отримані і проаналізовані п'ятидобові ембріони, співвідношення чоловіків і жінок склало 3:1. Частота вагітностей, що успішно розвиваються, була вище в групах, де носієм транслокації є чоловік. Показано значущу різницю між матерями та батьками-носіями у співвідношенні ембріонів зі збалансованими та незбалансованими транслокаціями. Від матерів їх отримано у відношенні 1:2,8, від батьків — 1:4,3. 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.

Оцінено результати ПГТ-А/СП клітин трофектодерми (ТЕ) ембріонів на п'яту добу розвитку шляхом секвенування нового покоління та FISH. З 64,3 % зразків, які отримали однакові генетичні характеристики обома методами, 45,7 % були еуплоїдні, 18,6 % — анеуплоїдні. Загальний зіставний результат при застосуванні двох методів — виявлення хромосомних аномалій або нормальний каріотип, отримані для 78,6 % ембріонів. Тому доцільним є поєднання методів дослідження ембріонів шляхом ПГТ-А/СП, особливо за їхньої обмеженої кількості та якості та у разі необхідності відбору ембріона для виключення розвитку генної патології шляхом ПГТ-М.

Визначено, що для родин з носійством транслокацій для виявлення транслокацій за ПГТ-СП доцільно застосування FISH в кілька раундів для верифікації сегрегуючої транслокації або за допомогою NGS з попереднім використанням GTG-методу для підтвердження хромосомної перебудови батьків. Встановлено, що ПГТ-М та ПГТ-А, проведені одночасно для виключення анеуплоїдії і мутацій, що обумовлюють моногенну патологію, дали можливість розвитку вагітності та народження здорових дітей у 66,3 % випадків.

Оцінено, що за ПГТ-М і ПГТ-А дослідження ембріонів на п'яту добу розвитку дозволяє отримати зіставні з результатами на третю добу показники народження здорових дітей.

Доведено, що за ПГТ генетичних захворювань, зумовлених мутаціями *de novo*, дослідження різних біологічних зразків від батьків обох статей дають зіставні результати за показниками ембріонів і народжених здорових дітей. Продемонстровано, що за ПГТ-М для мутацій *de novo* відмічено загальний клінічний результат на рівні 49,8 % здорових вагітностей і народження тільки здорових дітей. Таким чином, підходи до вибору методів генетичного аналізу можуть відрізнятися в залежності від типу успадкування мутації, статі носія мутації *de novo*, побажань сім'ї щодо можливості тестування тих чи інших зразків у зв'язку з юридичними, релігійними або етичними обмеженнями, але загальний підхід включає ідентифікацію

походження мутації *de novo*, пошук можливого гонадного мозаїцизму і відповідних батьківських гаплотипів.

Розвиток технологічних і методологічних можливостей дозволяє як підвищити результативність допомоги сім'ям, які потребують ДРТ, так і розширити коло таких сімей за рахунок розробки індивідуального підходу до ПГТ.

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

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ 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: 10.7124/feeo.v27.1325. (Дисертант брав участь у розробці методології дослідження, інтерпретації результатів, підготовці статті до публікації).

2. Ilyin 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. DOI: 10.1038/bmt.2017.46. (Дисертант брав участь у проведенні досліджень, у 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: 10.7124/feeo.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: 10.7124/visnyk.utgis.14.1.539. (Дисертант брав участь у розробці методології дослідження, інтерпретації результатів, підготовці статті 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. (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 телец. *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: 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. 3rd ed. London : CRC Press, 2014. 328 pp. DOI: 10.1201/b16719. (*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 доп. XVII міжнар. наук. конф. студ., мол. вчених та фахівців, присвяч. 215-річчю заснування мед. ф-ту Харків. нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна, Харків, 26–27 бер. 2020 р.* Харків : ХНУ ім. 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 транслокацій людини у програмах допоміжних репродукційних технологій. *Актуальні питання сучасної медицини : тези доп. XVII міжнар. наук. конф. студ., мол. вчених та фахівців, присвяч. 215-річчю заснування мед. ф-ту Харків. нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна, Харків, 26–27 бер. 2020 р.* Харків : ХНУ ім. 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 доп.*

XVI міжнар. наук.-практ. конф., Харків, 28–29 бер. 2019 р. Харків : ХНУ ім. 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 доп. XV міжнар. наук. конф. студ., мол. вчених та фахівців, Харків, 25–26 квіт. 2018 р. Харків : ХНУ ім. 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 доп. XV міжнар. наук. конф. студ., мол. вчених та фахівців, Харків, 25–26 квіт. 2018 р. Харків : ХНУ ім. 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 доп. XIV міжнар. наук. конф. студ., асп., докт., мол. вчених та фахівців, Харків, 30–31 бер. 2017 р. Харків : ХНУ ім. 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 доп. XIV міжнар. наук. конф. студ., асп., докт., мол. вчених та фахівців, Харків, 30–31 бер. 2017 р. Харків : ХНУ ім. 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 наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків, 23–24 трав. 2017 р. Харків, 2018. С. 40–41.

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 Sciences in Biology, speciality 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 provides a theoretical generalization and solution of a scientific problem, which consists of determining the genetic characteristics of families that most often need assisted reproductive technologies (ART) and optimizing the PGT-A/SR and PGT-M, taking into account their characteristics.

It is known that at present the birth of healthy offspring in families with reproductive disorders and genetic diseases is possible due to the development of technological and methodological capabilities. In the population aspect, the weakening of the selection pressure against certain genotypes or karyotypes will lead to an increase in their prevalence among the population, and, as a consequence, the population will have a “genetic burden”, additional economic and social burden. On the other hand, studies of the mechanisms of the emergence and development of genetic disorders and the accumulation of new data make it possible to expand the understanding of the fundamental foundations of life, understanding the processes of development of an organism at different stages.

For individual families, the possibilities of ART contribute to the birth of healthy children, therefore, in this area, it seems appropriate to optimize the methodology of helping families, taking into account their biological and social characteristics. The unique needs of individual patients, differences in local or

national regulations, and laboratory methods may account for differences in the way preimplantation genetic testing (PGT) is practiced, from initial referral to IVF treatment, genetic testing, and follow-up to pregnancy, childbirth and children. Since within the limits of the current legislation, the rules and conditions may vary between countries and between centers, in accordance with the characteristics and needs of the families of patients, it is advisable to form their own preimplantation genetic testing strategies to increase the effectiveness of ART technologies.

The aim of the study was to determine the genetic characteristics of parental carriers of chromosomal and gene mutations and their embryos and to optimize preimplantation genetic testing of aneuploidies/structural rearrangements (PGT-A/SP) and monogenic disorders (PGT-M). When conducting laboratory genetic analysis, general biological information about patients, medical documentation, samples of biological material were used: venous blood, semen, blastomeres, trophoctoderm, blastocle fluid of early embryos. A retrospective analysis of the database of 69 translocation carriers and 193 embryos, and data of 291 translocation carriers in PGT-A/SP programs from families with reproductive disorders, namely infertility, stillbirth, miscarriage, miscarriage, azoospermia, and others was performed. To compare the effectiveness of the use of technologies in PGT-A, data were analyzed about 70 embryos, assessed by several methods simultaneously, and two groups of embryos in the amount of 287 and 365, the cytogenetic characteristics of which were determined by different methods.

To analyze the results of PGT-M, we analyzed information on 1,149 patients from families with monogenic pathologies and 4,419 of their embryos. Materials about the simultaneous execution of PGT-M and PGT-A were studied about 83 families, 1,054 embryos. During PGT-M, materials for 152 families and 403 embryos were analyzed to study de novo mutations. When evaluating the morphology of zygotes, 352 oocytes were analyzed to predict the potential of the embryo. For the study of karyotypes, a standard technique was used for the cultivation of peripheral blood lymphocytes and the preparation of preparations of metaphase chromosomes and interphase nuclei. Zygote assessment was performed by the Z-assessment method, determination of the qualitative characteristics of

embryos — according to Gardner on the fifth day after fertilization. To assess cytogenetic, molecular-cytogenetic and molecular characteristics, NGS and FISH were used. The creation of databases and statistical calculations were carried out using the Microsoft Excel software package of the Windows XP Professional 1–2 CPU operating system (Microsoft, USA), license No. X08-73060. To process images of cytogenetic preparations, the software of the MetaSystems (Germany), license No. ISS-0299, was used. For studies using standard cytogenetic methods, the Ikaros program was used, for molecular cytogenetic studies using fluorescence, the Isis program. To process the data obtained using next-generation sequencing, the primary sequencing results were automatically sent from the IonS5 to the Thermo Fisher Cloud, which analyzed the data and formed embryo profiles. Determination of the presence of mutations was performed using the Bio-Rad CFX Manager 3.1 application (Bio-Rad, USA). Statistical analysis was carried out by checking the distribution of quantitative dates for compliance with the law of normal distribution using the Shapiro–Wilk and Kolmogorov–Smirnov methods. Comparison of arithmetic means was carried out according to Student's test. The difference in the frequencies of the estimated parameters was determined using the Fisher transformation by means of an angular transformation. The existence of relationships between the characters was assessed by the method of correlation analysis according to Pearson and Spearman. When conducting multiple comparisons, the Bonferroni correction was introduced in some cases. Statistical hypotheses were tested using the t and χ^2 tests.

Based on the results of the study, it was found that on the fifth day of development, the nature of the distribution of embryos, depending on the category of zygotes, statistically significantly differed from both uniform and indicators on the third day – the largest number of embryos was obtained from zygotes of categories Z1 and Z2, for which the largest number of morphologically quality AA grade blastocysts — 69.0% and 60.9%. Thus, it is advisable to study embryos on the 5th day of development, when the possibility of selecting viable embryos that originate from zygotes of categories Z1–Z3 is higher, and the probability of damage to the embryo is lower. Assessment of the quality of the zygote according

to morphological criteria is important not only for predicting the development of the embryo, but also for planning the type of protocol for stimulating superovulation. This is especially true for families in which the possibility of obtaining embryos or their quantity and quality is limited.

It was determined that five-day-old embryos with balanced translocations accounted for 20.7% of all those received from parents with reciprocal translocations, and embryos with euploid and balanced chromosomal set — 13.0%. Since literary and own indicators illustrate the effect of natural selection in favor of normal or balanced chromosome sets, it is expedient, in our opinion, to conduct preimplantation genetic testing for structural rearrangements in the embryo on the fifth or sixth day of development, especially since it is at the blastocyst stage that the embryo enters into the uterus in the natural cycle. It was proved that among the persons from whom five-day embryos were obtained and analyzed, the ratio of men and women was 3:1 — the frequency of successfully developing pregnancies was higher in the groups where the translocation carrier is a man. A significant difference has been shown between mothers and fathers-carriers in the ratio of embryos with balanced and unbalanced translocations. From their mothers it was received in a ratio of 1:2.8, from fathers — 1:4.3. Analysis of the results of clinical pregnancies and children born after PGT-A/SP showed that healthy children were born in 31% of families in which the translocation carrier was a woman, and in 43% of families in which the translocation carrier was a man.

The results of PGT-A/SP of trophectoderm cells of 5-day-old embryos were evaluated by NGS and FISH hybridization. Of 64.3% of the samples that received the same genetic characteristics by both methods, 45.7% were euploid, 18.6% were aneuploid. A general comparable result when using two methods — detection of chromosomal abnormalities or normal karyotype, was obtained for 78.6% of embryos. In this regard, it seems advisable to combine methods for studying embryos by means of PGT-A/SP, especially when their quantity and quality are limited and, if necessary, the selection of an embryo to exclude the development of genetic pathology by means of PGT-M. It was determined that for families with a carriage of translocations for the detection of translocations in PGT-SP, it is

advisable to use FISH in several rounds to verify the segregating translocation or using NGS with the previous use of the GTG method to confirm the chromosomal rearrangements of the parents. It was found that PGT-M and PGT-A, carried out simultaneously to exclude aneuploidy and mutations causing monogenic pathology, ensured the development of pregnancy and the birth of healthy children in 66.3% of cases.

It was estimated that with PGT-M and PGT-A, the study of embryos on the fifth day of development makes it possible to obtain indicators of the birth of healthy children comparable to the results on the third day with less time, economic and reproductive stress. It has been proven that in OGT of genetic diseases caused by *de novo* mutations, studies of various biological samples from parents of both sexes give comparable results in terms of embryos and healthy children born. It was shown that with the PGT-M strategy for *de novo* mutations, an overall clinical result was noted at the level of 49.8% of healthy pregnancies and the birth of only healthy children. Thus, research strategies may differ depending on the type of inheritance of the mutation, the sex of the *de novo* mutation carrier, the wishes of the family if it is possible to test certain samples due to religious or social characteristics, but the general approach includes identifying the origin of the *de novo* mutation, searching for a possible gonadal mosaicism and corresponding parental haplotypes.

It should be concluded that the development of technical and methodological capabilities allows both to increase the effectiveness of assistance to families in need of ART, and to expand the circle of such families through the development of an individual strategy of PGT.

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

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	19
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ТА АНАЛІЗ ЛІТЕРАТУРИ.....	25
1.1 Історичні аспекти преімплантаційного генетичного тестування.....	25
1.2 Сучасне бачення концепції преімплантаційного генетичного тестування, рекомендації ESHRE та ASRM, Європейського товариства репродукції та ембріології людини та Американського товариства репродукційної медицини	26
1.2.1 Сучасні поняття в галузі ДРТ	27
1.2.2 Критерії включення/виключення пацієнтів в програми ПГТ.....	27
1.2.3 ПГТ-М, мітохондріальні патології і HLA-типуювання.....	28
1.2.4 ПГТ-СП і ПГТ-А	29
1.2.5 ПГТ і генетичне консультування	30
1.3 Методи ПГТ	32
1.3.1 Історичні аспекти розвитку методів, використовуваних за ПГТ.....	32
1.3.2 Кількісна ПЛР у реальному часі (RT-PCR)	33
1.3.3 Флуоресцентна гібридизація <i>in situ</i> (FISH)	33
1.3.4 Повногеномна ампліфікація (WGA)	34
1.3.5 Порівняльна геномна гібридизація (CGH) і мікроматрічна порівняльна геномна гібридизація (aCGH)	34
1.3.6 Секвенування наступного покоління (NGS).....	35
1.4 Національні особливості законодавства і біоетика за ПГТ	36
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	40
2.1 Матеріали дослідження	40
2.2 Методи дослідження	41
2.2.1 Дослідження каріотипу.....	41
2.2.2 Отримання ембріонів для ПГТ	42

	17
2.2.3 ПГТ ранніх ембріонів	47
2.2.4 Програмне забезпечення	57
2.2.5 Статистичний аналіз	58
РОЗДІЛ 3 ДОСЛІДЖЕННЯ ДИНАМІКИ РОЗВИТКУ ЕМБРІОНІВ З	
УРАХУВАННЯМ МОРФОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЗИГОТ.....	59
РОЗДІЛ 4 ТРАНСЛОКАЦІЇ І ПРЕІМПЛАНТАЦІЙНЕ ГЕНЕТИЧНЕ	
ТЕСТУВАННЯ АНЕУПЛОЇДІЙ/СТРУКТУРНИХ ПЕРЕБУДОВ	65
4.1 Визначення генетичних особливостей носіїв транслокацій з родин,	
що потребують ДРТ	65
4.1.1 Цитогенетичні характеристики носіїв транслокацій.....	65
4.1.2 Термін розвитку ембріонів під час аналізу і їхні кількісні та	
якісні характеристики.....	69
4.1.3 Участь різних хромосом у транслокаціях батьків,	
інтерхромосомний ефект і кількісні та якісні характеристики	
ембріонів	70
4.1.4 Стать батьків-носіїв транслокації і кількісні та якісні	
характеристики ембріонів	73
4.1.5 Вік батьків-носіїв транслокації і кількісні та якісні	
характеристики ембріонів	75
4.1.6 Сегрегація транслокацій в мейозі батьків і кількісні та якісні	
характеристики ембріонів	76
4.1.7 Оцінка показників відбору щодо носіїв транслокацій	79
4.2 Оптимізація скринінгу хромосомного набору ембріонів.....	82
4.2.1 Порівняння ефективності NGS і FISH технологій: комплексний	
скринінг 24 хромосом ембріонів	82
4.2.2 Приклади визначення транслокацій за ПГТ-А/СП.....	90
РОЗДІЛ 5 МОНОГЕННІ ПАТОЛОГІЇ І ПРЕІМПЛАНТАЦІЙНЕ	
ГЕНЕТИЧНЕ ТЕСТУВАННЯ.....	99
5.1 Преімплантаційне генетичне тестування моногенних захворювань	99

5.1.1	Визначення характеристик родин з моногенними патологіями, які звертаються до ПГТ-М	99
5.1.2	Вік батьків із родин з груп ризику щодо моногенних патологій та комбіноване ПГТ-М та ПГТ-А	101
5.1.3	Термін розвитку ембріонів та комбіноване ПГТ-М та ПГТ-А	102
5.1.4	HLA-типівання як фактор тестування анеуплоїдії одночасно з ПГТ-М	103
5.1.5	ПГТ моногенних захворювань, зумовлених мутаціями <i>de novo</i> ...	107
5.2	Оптимізація преімплантаційного генетичного тестування для попередження моногенної патології	112
5.2.1	Походження мутації і мета дослідження для визначення алгоритму ПГТ-М	112
5.2.2	Приклади визначення мутацій за ПГТ-М	117
РОЗДІЛ 6 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ		127
ВИСНОВКИ		131
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ		133
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ		135
ДОДАТКИ		165

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- ADO — allelic drop-out, випадання алеля
- CBG — C banding (метод фарбування хромосом)
- CGH — comparative genomic hybridization (порівняльна геномна гібридизація)
- FISH — fluorescence *in situ* hybridization (флуоресцентна гібридизація *in situ*)
- GTG — G banding (метод фарбування хромосом)
- ICSI — intracytoplasmic sperm injection (інтрацитоплазматична ін'єкція сперматозоїда)
- LD — linkage disequilibrium (нерівновага за зчепленням)
- NGS — next generation sequencing (секвенування наступного покоління)
- SNP — single nucleotide polymorphism (однонуклеотидний поліморфізм)
- BBP — вроджені вади розвитку
- BOOЗ — Всесвітня організація охорони здоров'я
- ДНК — дезоксирибонуклеїнова кислота
- ДРТ — допоміжні репродукційні технології
- ЗІВ — запліднення *in vitro*
- MBBP — множинні вроджені вади розвитку
- МОЗ — Міністерство охорони здоров'я
- МЦ — медичний центр
- ПГС — преімплантаційний генетичний скринінг
- ПГТ — преімплантаційне генетичне тестування
- ПГТ-А/СП — преімплантаційне генетичне тестування анеуплоїдій/
структурних перебудов
- ПГТ-М — преімплантаційне генетичне тестування моногенних патологій
- ПЛР — полімеразна ланцюгова реакція (polymerase chain reaction, PCR)
- СГЯ — синдром гіперстимуляції яєчників
- ТЕ — трофоектодерма
- УЗД — ультразвукове дослідження
- ХА — хромосомні аномалії

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. У теперішній час сім'ї в розвинених країнах відкладають народження дитини на більш пізній вік. Зрілий вік потенційних батьків пов'язаний зі зниженням фертильності, ризиком генетичних порушень та, найчастіше, необхідністю застосування допоміжних репродукційних технологій (ДРТ). В результаті запліднення *in vitro* (ЗІВ) в світі народилося понад 5 мільйонів немовлят, що щорічно складає приблизно 350 000 дітей, та очікується, що ця кількість буде зростати та впливати на показники генетичного тягаря, економічне та соціальне навантаження населення, оскільки в 95 % процедур ЗІВ генетичне тестування ембріонів не проводиться [1–5].

Найбільш поширеною та інтернаціональною категорією пацієнтів, які звертаються до ДРТ для проведення преімплантаційного генетичного тестування (ПГТ), є особи з родин з моногенними порушеннями або специфічними хромосомними аномаліями, зокрема, збалансованими транслокаціями хромосом [6–9]. Транслокації можуть не викликати фенотипових змін та не заважати соціальній ролі людини, але бути причиною зниження фертильності або появи нащадків з хромосомними патологіями [6, 10, 11]. Для носіїв мутацій, які обумовлюють моногенні захворювання, ДРТ зазвичай є єдиною можливістю мати здорових дітей.

Отримати здорових нащадків у родинях з порушеннями репродукційної функції та генетичними захворюваннями можливо завдяки розвитку технологічних та методологічних можливостей виконання преімплантаційного генетичного тестування анеуплоїдій/структурних перебудов (ПГТ-А/СП) та моногенних порушень (ПГТ-М). Всі варіанти ПГТ призначені для мінімізації шансів на перенесення генетично аномальних ембріонів, які утворилися після ЗІВ [4, 7, 8], тому для отримання найбільш ефективного результату використання молекулярних технологій також

важливо точно визначити об'єкт і завдання дослідження, необхідність попередніх етапів досліджень, ступінь точності очікуваних результатів.

Крім того, унікальні потреби окремих пацієнтів, відмінності в місцевих або національних правилах і лабораторних методах, юридичних нормах та релігійних обмеженнях, можуть обумовлювати різницю в способах практики ПГТ, особливо під час вибору підходів до генетичних досліджень [7]. Оскільки в межах відповідного законодавства правила та умови можуть варіювати не тільки між країнами, але і між медичними центрами [7], уявляється актуальним формування власних підходів до ПГТ, з урахуванням біологічних та соціальних особливостей родин пацієнтів. Саме тому аналіз 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. Дисертаційна робота виконувалась згідно 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) та моногенних порушень (ПГТ-М).

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішено 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 для визначення генних мутацій та їхніх поєднань при ПГТ-М.

6. Запропонувати рекомендації щодо оптимізації ПГТ-А/СП та ПГТ-М з урахуванням 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-типування під час преімплантаційного генетичного тестування генних мутацій та анеуплоїдій дає можливість народження здорового HLA-ідентичного донора для лікування осіб з патологіями, що потребують алогенної трансплантації кісткового мозку. Встановлено, що при ПГТ у родинях з мутаціями *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 родинях 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 Міжнародної наукової конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», присвяченої 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 дисертаційної роботи 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 з переліку умовних позначень, вступу, огляду та аналізу 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ТА АНАЛІЗ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Історичні аспекти преімплантаційного генетичного тестування

Преімплантаційне генетичне тестування (ПГТ) почало розвиватися в останнє десятиліття минулого століття і пройшло шлях від експерименту до комплексу заходів, альтернативних інвазивній пренатальній діагностиці і вимушеному перериванню вагітності. Робота, присвячена ПГТ у сім'ях з Х-зчепленими патологіями, для визначення статі з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції, з інформацією про народжених дітей, була представлена в 1990 році [12]. Наступним кроком методологічного розвитку цього напрямку стало мультиплексне тестування з використанням коротких тандемних повторів, які ампліфікувались разом з мутантними послідовностями. Флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH) була представлена кількома роками пізніше і стала використовуватись як стандартний метод для визначення статі ембріона і детекції чисельних і структурних хромосомних порушень [13]. Тестування ембріона на стадії восьми бластомерів залишалося методом вибору для виключення анеуплоїдії і генетичної патології до останнього десятиліття, коли технології повногеномного аналізу стали замінювати «золотий стандарт» — методи FISH і ПЛР, і розширили можливості отримання інформації про каріотипи і генотипи ембріона на стадії бластоцисти. У першу чергу ці досягнення стали очевидними за ПГТ-А, яке проводилось у першу чергу для жінок із заплідненням *in vitro* (ЗІВ) для підвищення частоти настання вагітностей на ембріотрансфер і зниження частоти репродукційних втрат. Інші критерії оцінки результатів ДРТ, такі як збільшення планового перенесення одного ембріона і скорочення часу, необхідного до настання вагітності, були рекомендовані пізніше. Крім того, завдяки розвитку технологій стало можливим одночасне проведення ПГТ-М і ПГТ-А [1, 14–19]. Таким чином,

до теперішнього часу, можливості ПТГ стали достатньо широкими, що дозволяє проводити дослідження в сім'ях з різними потребами, біологічними та соціокультурними особливостями, з використанням різних біологічних зразків [20–28].

1.2 Сучасне бачення концепції преімплантаційного генетичного тестування, рекомендації ESHRE та ASRM, Європейського товариства репродукції та ембріології людини та Американського товариства репродукційної медицини

У світі щорічно народжуються мільйони дітей з генетичними захворюваннями, багато з яких вмирають у дитячому віці, а ті, що вижили, у більшості своїй потребують коштовного і не завжди ефективного лікування протягом усього свого життя [29]. Використання в клінічній практиці пренатальної діагностики хоча і дозволяє частково вирішити цю проблему, передбачає проведення абортів, що спричинює протести і засудження в багатьох країнах і соціальних групах. За загальними оцінками експертів, на даний час уже щорічно близько 350 000 дітей з'являються на світ у результаті ЗІВ, і, можливо, ця кількість буде ще вищою, так як в країнах з високим рівнем життя жінки відкладають народження дитини на більш пізній вік, а пізній репродукційний вік пов'язаний зі зниженням фертильності і необхідністю вдаватися до ДРТ для попередження народження дітей з генетичними патологіями [1, 2, 30]. У зв'язку з цим залишається актуальною проблема розробки і вдосконалення методів ПТГ без втручання до ембріона, що розвивається [1, 31].

Наукові та технічні досягнення останніх років вимагають оновлення розроблених раніше рекомендації ESHRE щодо передової практики ПТГ для забезпечення загальної стандартизації та поліпшення стандартів якості, які були опубліковані у 2005 і 2011 роках.

Основні принципи передової практики репродукційних технологій розробили кілька світових товариств, для того, щоб довести ПТГ до такого

високого рівня якості, як і рутинне генетичне тестування. Американське товариство репродукційної медицини розглянуло практику ПГТ в США в 2008 році і опублікувало кілька оглядів, які висвітлюють питання роботи з ембріонами на стадії бластоцисти, перенесення ембріонів і ПГТ-А [32].

У 2020 році Європейським товариством репродукції та ембріології людини (ESHRE) були прийняті оновлені рекомендації щодо передової практики преімплантаційного генетичного тестування, які є актуальними для регулювання і стандартизації цього напрямку практики ДРТ [7, 33, 34].

Нові документи присвячені, у тому числі, різним технічним аспектам біопсії ембріона, ПГТ-М — для виключення моногенних патологій, ПГТ-А/СП — для виключення хромосомних структурних перебудов/анеуплоїдій. Надано рекомендації для заходів до початку циклу ПГТ з подробицями про включення та виключення пацієнтів з проєктів, про консультування та надання інформації родинам хворих, про ведення вагітних і спостереження новонароджених, інструкції з організації центрів ЗІВ/ПГТ [7, 33, 34].

1.2.1 Сучасні поняття в галузі ДРТ. ПГТ визначається як дослідження, яке проводиться для аналізу ДНК, виділеної з ооцитів або полярних тілець, або ембріонів на стадії дроблення або бластоцисти для детекції генетичних порушень або для HLA-типуювання. Загальне поняття ПГТ включає ПГТ для виключення анеуплоїдії (ПГТ-А, PGT-A), ПГТ для виключення моногенних порушень (ПГТ-М, PGT-M) і ПГТ для виключення хромосомних структурних перебудов (ПГТ-СП, PGT-SR) [7, 33–35].

В останні рекомендації були включені критерії оцінки результатів ДРТ, такі як збільшення планового перенесення одного ембріона і скорочення часу до настання вагітності. Ці показання для ПГТ-А включають критичний репродуктивний вік матері, рецидивуючу невдалу імплантацію, зниження чоловічої фертильності, повторний викидень у пар з нормальним каріотипом [7, 8, 19, 33–36].

1.2.2 Критерії включення/виключення пацієнтів в програми ПГТ. Питання про включення або відмову пацієнтові до участі в програмах ПГТ

рекомендується розглядати консилиуму фахівців клінічних генетиків, генетичних консультантів, молекулярних біологів/цитогенетиків, ембріологів, психологів, клінічних фахівців з ЗІВ на підставі чітко визначених критеріїв з урахуванням генетичних особливостей родини, патології, мети дослідження. Програми ПГТ рекомендують у тому випадку, якщо генетична діагностика технічно здійсненна та надійність діагнозу є високою [37–41]. У даний час поточні процедури в більшості центрів ЗІВ/ПГТ допускають загальний рівень помилок, які призводять до невірного діагнозу, від 1 до 3 % [19]. Кожен медичний центр повинен знати про свої показники помилок і повідомляти цю інформацію під час спілкування з пацієнтом [7].

Як можливі критерії виключення з програм ПГТ рекомендується розглядати питання безпеки здоров'я пацієнта, вік жінки, складність отримання чоловічих або жіночих гамет, протипоказання до ЗІВ, пов'язані з біологічними або іншими факторами. Так само актуально врахувати особливості, симптоми і клінічні ознаки генетичної патології пацієнта, з приводу якого планується ПГТ, яка може спричиняти ускладнення під час стимуляції яєчників, отримання ооцитів, вагітності або медичні ризики під час пологів. Важливо також врахувати наявність в одного з партнерів серйозних фізичних або психологічних проблем, пов'язаних з досліджуваним захворюванням або з іншими станами [7, 33–35].

1.2.3 ПГТ-М, мітохондріальні патології і HLA-типування. До ПГТ-М відносять дослідження патогенного варіанта або варіантів ДНК, що обумовлює моногенні порушення або їх комбінації, Х-зчеплені, аутосомно-домінантні або рецесивні, для яких точно ідентифіковані локуси, які спричиняють захворювання, ядерні або мітохондріальні. ПГТ-М може бути проведено для мутацій у випадках гонадного мозаїцизму, що з високою ймовірністю можуть бути причиною розвитку у нащадків захворювань з серйозними наслідками для здоров'я, які можуть проявитися на будь-якому етапі онтогенезу [35, 42].

ПГТ-М за мітохондріальних хвороб, спричинених патогенним варіантом мітохондріальної ДНК (мтДНК) дозволяє ідентифікувати ембріони з навантаженням патогенних варіантів мтДНК нижче порога клінічної експресії, що забезпечить ефективну стратегію зниження ризику розвитку захворювання. Оскільки цей поріг часто не встановлений і для рідкісних і для поширених патогенних мутацій, аналіз, виконаний для всіх відомих патогенних варіантів мтДНК продемонстрував, що ембріони з генетичним вантажем до 18 % мають ймовірність більше 95 % бути нормальними і можуть бути рекомендовані до переносу в порожнину матки. У сім'ях, коли патогенна мутація, що спричиняє мітохондріальну хворобу, кодується ядерною ДНК, дослідження проводиться так само, як за інших моногенних порушень [7].

Відбір HLA-ідентичних ембріонів за ПГТ можливий для сімей, в яких вже є дитина, яка має злоякісне, придбане або генетичне захворювання, за якого хвора дитина може бути вилікувана, або його очікувана тривалість життя може бути значно продовжена завдяки трансплантації стовбурових клітин від HLA-ідентичного сибса. Тестування рекомендується проводити тільки для HLA-типування, якщо ризик рецидиву захворювання низький, або в поєднанні із дослідженням аутосомно-домінантних/рецесивних або Х-зчеплених порушень [7, 43–45].

1.2.4 ПГТ-СП і ПГТ-А. ПГТ-СП є загальноприйнятою процедурою в більшості центрів ЗІВ/ПГТ. Цей вид тестування був запропонований для пацієнтів, які не можуть завагітніти або мають високий ризик втрати вагітності і нащадків з порушеннями різного ступеня тяжкості через успадкування незбалансованих структурних перебудов. У разі реалізації такого підходу в залежності від технології — FISH-гібридизації, кількісної ПЛР у реальному часі, комплексних методів тестування (мікроматричної порівняльної геномної гібридизації — aCGH або секвенування наступного покоління — NGS), можуть застосовуватися різні критерії включення або виключення. Зазвичай ПГТ-СП рекомендується у випадку, якщо

застосовуваний підхід дозволяє виявити всі очікувані незбалансовані хромосомні перебудови [7, 46].

Показання для ПГТ-А включають критичний репродукційний вік матері, повторювану невдалу імплантацію, знижену чоловічу фертильність, повторні викидні у пар з нормальним каріотипом. Важливо відзначити, що пари з нормальним каріотипом в анамнезі мають високі шанси на успішне зачаття природним шляхом і, за результатами нещодавніх рекомендацій, проведення ПГТ-А без генетичної причини не рекомендується [7, 46–49].

1.2.5 ПГТ і генетичне консультування. Консультування за ПГТ включає консультування, пов'язане з лікуванням ЗІВ, і безпосередньо генетичне консультування. Передбачається, що консультації зазвичай повинні включати обговорення таких питань, як: урахування генетичного ризику в світлі молекулярного або цитогенетичного підтвердження діагнозу, ступеня тяжкості та варіабельності стану і наявності або відсутності зв'язку між генотипом і фенотипом; принцип тесту, згідно з яким, у залежності від показань, для лабораторних досліджень можуть знадобитися біологічні зразки і результати генетичних досліджень не тільки пари, а й членів сім'ї, інформація про яких необхідна для аналізу; умови, на яких проводиться тестування, методи і обмеження тесту; передбачувані терміни лабораторного дослідження і лікування; звіт про результати і про політику клініки або центру з приводу випадкових виявлень; прийняття рішень про прийнятність ембріонів для переносу/вітрифікації — таке питання потрібно обговорити з пацієнтами перед початком лікування, так як може знадобитись повторний візит; рішення щодо недосліджених ембріонів і ембріонів, що не підлягають передачі іншим особам; неперенесені ембріони можуть бути використані для оптимізації тестів; вплив хромосомного мозаїцизму доімплантаційних ембріонів на результати дослідження та політику центру з перенесення ембріонів; можливість помилкового діагнозу і величина частоти помилок, виражена як помилково негативні або позитивні результати, ґрунтується на «внутрішніх» дослідженнях і подальшому аналізі конкретних діагностичних

тестів або стратегій; варіанти і рекомендації для пренатальної діагностики за настання вагітності для підтвердження результату ПГТ [7, 33, 34, 46, 50–52].

Залежно від генетичної патології і дослідження, яке буде проводитися, під час консультування доцільно розглянути такі позиції: за структурних перебудов хромосом використана технологія може не завжди дати можливість диференціювати нормальні та збалансовані варіанти; за аутосомно-рецесивних і Х-зчеплених рецесивних захворювань необхідно обговорити перенесення ембріонів-носіїв відповідно до місцевого законодавства та правил; для Х-зчеплених захворювань, за яких виявлення певних патогенних варіантів ускладнено, необхідно озвучити плюси і мінуси визначення статі ембріона: усі чоловічі ембріони, які мають генетичне порушення або здорові, будуть еліміновані, а ембріони жіночої статі неможливо ідентифікувати як здорові або такі, що мають генетичне порушення; можливість розкриття статі ембріона узгоджується з положеннями місцевого законодавства; для моногенних захворювань, обумовлених динамічними патогенними мутаціями з нестабільністю повторів, за яких тестування включає визначення розміру повтору, пара повинна бути проінформована про поріг кількості повторів, нижче якого ембріони можуть бути рекомендовані до переносу; для HLA-типуювання доцільно уточнити теоретичну кількість ембріонів, придатних до переносу. Необхідно обговорити перспективи здорових ембріонів, HLA-неідентичних, з урахуванням місцевих та національних нормативних положень. Усі потенційні обмеження повинні бути доведені до відома пари, включаючи ймовірність виявлення непридатних до перенесення ембріонів і проблеми трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин [7, 33, 34, 46–49].

Важливим питанням є необхідність уточнення потенційним батькам інформації про ймовірність можливості ідентифікації і вибору генетично придатних до перенесення ембріонів:

- 25 %, або один з 4 ембріонів після біопсії можуть бути генетично придатні до перенесення за виконання тільки преімплантаційного HLA-типування;
- 18,8 %, або три з 16 — за одночасного виключення аутосомно-рецесивної або Х-зчепленої рецесивної патології;
- 12,5 %, або один з 8 — за виключення аутосомно-домінантного захворювання.

Необхідно також уточнити можливість кросинговеру у пробанда, що веде до зниження ймовірності ідентифікації непридатного до перенесення ембріона. За проведення ПГТ-М або ПГТ-СП в поєднанні з ПГТ-А слід обговорити політику перенесення ембріонів і їх ранжування [7, 33, 34, 50–52].

1.3 Методи ПГТ

1.3.1 Історичні аспекти розвитку методів, використовуваних за ПГТ. Удосконалення методів, які застосовуються за ПГТ, молекулярних, цитогенетичних, повногеномного аналізу, призвело не тільки до підвищення ефективності тестування ембріонів [53–56], але і до необхідності врахування технічних особливостей технологій, що впливають на об'єктивність отриманого результату.

Розвиток ПГТ-М почався з використання методу ПЛР для поодиноких клітин, і головною проблемою отримання об'єктивного результату і правильного діагнозу стала можливість контамінації зразка і випадання алелей (ADO) [4, 8], що необхідно мінімізувати, вживши заходів профілактики.

ADO виникає як наслідок нерівної ампліфікації алелей, присутніх у гетерозигот, у результаті чого один з алелів може виявитися неідентифікованим. Контроль за ADO залежить від оптимізації методів лізису і ампліфікації клітин, а також чутливості методів детекції алелей. Першочерговим заходом щодо контролю та виявлення ADO контамінації є

використання зчеплених високоінформативних маркерів — коротких tandemних повторів (STR) за постановки ПЛР, що підвищує точність результату у разі роботи з однією або декількома клітинами. Такий підхід, або гаплотипування, вважався «золотим стандартом» протягом майже трьох десятиліть. Обмеженням цього методу є трудомісткість розробки і перевірки умов мультиплексної ПЛР для роботи з однією клітиною, і, як наслідок, тривалий час очікування результату [4, 8, 57, 58].

1.3.2 Кількісна ПЛР у реальному часі (RT-PCR). Метод кількісної ПЛР у реальному часі є швидким, точним і економічно ефективним методом дослідження ембріонів і застосовується для оцінки біопсій ТЕ [59, 60]. ПЛР за такого підходу виконується безпосередньо на зразку без необхідності проведення етапу повногеномної ампліфікації. Тривалість процедури становить близько 4 год і може поєднуватися з детекцією мутацій, що є найбільш суттєвими перевагами методу. Обмеженням методу є неможливість ідентифікації, наприклад, мозаїцизму [59–61].

1.3.3 Флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH). Застосування методу FISH почалося близько тридцяти років тому з використання зондів на X і Y хромосоми для сімей зі зчепленими зі статтю захворюваннями, для визначення статі ембріонів як альтернативи ПЛР, для скринінгу анеуплоїдії з оцінкою кількості копій хромосом у хромосомах X, Y, 13, 18 і 21 [4, 62–64].

Метод має обмеження, незалежно від стадії біопсії. Кількість досліджуваних хромосом є частиною усього хромосомного набору, і суб'єктивність підходу до її оцінки може збільшити ймовірність хибнопозитивних і помилково негативних результатів, що може привести до елімінації здорових ембріонів, визначених як аномальні, або перенесення аномальних ембріонів, визначених як нормальні. Зазвичай FISH використовується для скринінгу 9–12 хромосом, що дозволяє виявити 60–80 % всіх анеуплоїдних ембріонів. Але оскільки може бути відзначена анеуплоїдія будь-який з хромосом, FISH не гарантує виявлення значної частини анеуплоїдій і часткових порушень у ембріонів. Підхід до аналізу

24 хромосом методом FISH на ембріонах людини має технічні складності — перекриваються гібридизаційні сигнали, що залишає актуальним використання методу для дослідження ядерної організації та мозаїцизму у тому випадку, коли для аналізу доступні кілька клітин. Також обмеження методу включають професійну складову лабораторного персоналу [4, 65–68].

У даний час застосування FISH актуально для ідентифікації деяких типів транслокацій, за яких точка розриву є настільки дистальною, що її практично неможливо виявити іншими методами, заснованими на ПЛР, що мають обмеження дозволу. FISH також застосовується для ПГТ-А, проте методи повногеномного аналізу все частіше замінюють його [4].

1.3.4 Повногеномна ампліфікація (WGA). У зв'язку з тим, що основою для ПГТ-А є ДНК, виділена з декількох клітин для більшості масштабних програм, таких, як aCGH і NGS, потрібно застосування WGA, яка представлена методами, заснованими або не заснованими на ПЛР. Метод DOP-ПЛР є найбільш поширеним і комерціалізованим протоколом на основі ПЛР для ПГТ-А (SurePlex DNA Amplification System). Застосування декількох методів, гібридний похід, що дає більш високий рівень однорідності, специфічності, відтворюваності результатів і нижчі показники випадання алелей і детекції змін кількості копій хромосом, за анеуплоїдії (протокол SurePlex) є найбільш відповідним. Ефективним комплексним підходом є WGA з подальшими застосуванням повногеномних методів на основі масиву однонуклеотидних поліморфізмів або секвенування наступного покоління [4, 8, 53, 54, 69–72].

1.3.5 Порівняльна геномна гібридизація (CGH) і мікроматрічна порівняльна геномна гібридизація (aCGH). Уперше метод CGH застосовувався для скринінгу змін числа копій хромосом у солідних пухлинах. CGH використовує підходи, аналогічні FISH, на основі спільної гібридизації диференційно мічених досліджуваних і еталонних зразків ДНК з нормальними метафазними хромосомами. У той же час, на відміну від FISH, CGH полегшує оцінку числа копій хромосом усього каріотипу, сегментарних

анеуплоїдій і нестабільності генома, хоч і з обмеженим дозволом. Під час проведення ЗІВ метод був використаний для дослідження бластомерів. До обмежень методу відноситься необхідність кріоконсервування ембріонів, так як проведення дослідження вимагає часових витрат [73–76].

Метод aCGH має загальні етапи з CGH — WGA, флуоресцентне маркування зразків і хромосомний еталон нормальних хромосом [77], але замість гібридизації з метафазними хромосомами вона відбувається на мікрочіпах (бактеріальних штучних хромосомах або синтетичних олігонуклеотидах), а отримані результати аналізуються за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення [4, 77]. Метод автоматизований, швидкий і може бути використаний для дослідження біоптату на стадії бластоцисти з подальшим перенесенням ембріона. Крім численних змін хромосом, aCGH ідентифікує також сегментарні анеуплоїдії і незбалансовані перебудови, які виникають у результаті аномальної сегрегації фрагментів розміром до 2,5 Мб. aCGH застосовується для дослідження ембріонів на стадіях полярних тілець, розщеплення та бластоцисти [4, 25, 78–82].

1.3.6 Секвенування наступного покоління (NGS). Метод NGS був впроваджений в клінічну практику для скринінгу анеуплоїдії, як альтернатива і заміна aCGH. Після WGA, як і за aCGH, слідує етап кодування, що дозволяє ідентифікувати специфічні для ембріона послідовності, і продукт ампліфікації сегментується на невеликі фрагменти, які потім секвенують для детекції анеуплоїдії. Цей підхід дозволяє одночасно досліджувати велику кількість зразків, що знижує вартість процедури та навантаження на персонал. До переваг методу відносять використання технології платформи для одночасної оцінки анеуплоїдії, транслокацій, генних мутацій, невеликих варіацій кількості копій і низкорівневого мозаїцизму (< 25 %), можливості дослідження в одному циклі як ядерної, так і мітохондріальної ДНК. Існуючі рішення, наприклад OnePGT (Agilent), є універсальним додатком на основі NGS для ПГТ-М, ПГТ-СП і ПГТ-А. У той же час спрямованість спеціалізованого програмного забезпечення аналізу з високою специфічністю

виявлення мозаїцизму може представляти потенційний ризик гіпердіагностики мозаїцизму в еуплоїдних ембріонів. Підвищення чутливості може призвести до зниження специфічності — були представлені результати з високими (33 %) хибнопозитивними результатами [83–87].

1.4 Національні особливості законодавства і біоетика за ПГТ

Згідно Консорціуму ESHRE, за ПГТ, унаслідок відмінностей у місцевих або національних правилах і конкретних лабораторних методах, відмічено відмінності в засобах і методології практики ПГТ, починаючи від первісного напрямку до лікування ЗІВ, генетичного тестування і до подальшого спостереження за вагітністю, пологами і дітьми. У той же час можливі відмінності не заважають формуванню загальних рекомендацій з приводу передової практики, які засновані на результатах попереднього досвіду і отриманих доказів. Рекомендації науково-практичних спільнот не є затвердженими стандартами практики та не мають юридичної сили. Потреби окремих пацієнтів можуть бути підставою індивідуального підходу до них, а рекомендації доцільно застосовувати відповідно до індивідуальних особливостей пацієнта з урахуванням професійного досвіду. У той же час рекомендації і досвід можуть бути використані для розробки законодавчих положень і нормативних актів, і фахівці будуть забезпечувати їхню відповідність юридичним вимогам або інструкціям своїх країн. Але місцеві правила можуть варіювати між медичними закладами, як і критерії включення і виключення пацієнтів. У зв'язку з цим рекомендації науково-практичних спільнот слід розглядати як відправну точку для обговорення та розвитку [7, 32–34].

Інтенсивний розвиток ДРТ, які включають донорство сперми і ооцитів, сурогатне материнство, штучну інсемінацію, екстракорпоральне запліднення (ЕКЗ), інтраплазматичну ін'єкцію сперматозоїда (ІКСІ), ембріотрансфер, кріоконсервування гамет і ембріонів, ПГТ, зумовлює необхідність інтеграції питань репродуктології, генетики, ендокринології, гінекології, біоетики,

юриспруденції, політики. В останні десятиліття в усіх країнах світу, які дозволяють застосування ДРТ, відбувається переоцінка низки існуючих етичних, моральних і правових уявлень про відносини між суспільством, фахівцями, пацієнтами та іншими учасниками репродукційних технологій — донорами клітин та ембріонів, юридичними та біологічними батьками, сурогатними матерями, дітьми, які з'явилися в результаті виконання програм ДРТ. Сучасні перспективи репродукційного життя сім'ї доцільно планувати з урахуванням генетичних, медичних, етнічних, релігійних, культурологічних та юридичних аспектів [88–94].

Уперше дискусії про нетрадиційний з позицій сформованих уявлень про «таїнство зачаття» характер перерахованих вище підходів до подолання непліддя, невтручання людини в «справи Божі», були ініційовані католицькою церквою, яка грає в житті європейського суспільства істотну роль. Суттєве місце католицької церкви у житті країн Латинської Америки впливає на правове регулювання проблем. Наприклад, за ПГТ рішення пацієнтів про відмову перенесення «проблемного» ембріона розглядається в тому ж ракурсі, що й штучний аборт. Законодавство Італії відносно ДРТ вважається найжорсткішим з існуючих в Європі й досить обмежує можливості народження дітей після ЗІВ — таку можливість має пара, яка офіційно перебуває у шлюбі та довела стабільні відносини. В арабських країнах сильний вплив на розвиток ДРТ також мають релігійні погляди — проведення ПГТ можливо, якщо для отримання ембріона використовують яйцеклітини та сперматозоїди подружжя, які перебувають у законному шлюбі. Етика і мораль у країнах із сильними традиційними інститутами сім'ї та церкви, за відсутності розвіненої законодавчої бази в галузі ДРТ, грають роль стримуючих факторів. У ряді країн Європи — Німеччині, Австрії — постулати церкви про визнання заплідненої яйцеклітини індивідом або особистістю підкріплені законодавчими актами [39, 95–99].

Юридичне регулювання використання ДРТ найбільш активно розвивається в країнах Європи. Наприклад, у Великій Британії ПГТ, як

важливий захід профілактики та попередження народження дитини з генетичною патологією, дозволена тільки за наявності в сім'ї важкої генетичної хвороби. У той же час спектр патологій не визначений, що залишає можливість прийняття рішення щодо розвитку подій за пацієнтами і лікарями. Згідно з французьким законодавством, ДРТ доступні тільки для гетеросексуальних пар репродукційного віку, які прожили в шлюбі не менше двох років. У Швейцарії отримання біологічного матеріалу до ПГТ шляхом проведення біопсії blastomerів заборонено законом про ДРТ, тому в Швейцарії ПГТ проводиться з використанням полярних тілець ооцитів. Одне з найбільш ліберальних законодавств щодо проведення ПГТ має Ізраїль. Ймовірно, високий рівень інбридингу та висока частота серед населення моногенної рецесивної патології, наприклад, таласемії і хвороби Тея-Сакса, зумовлюють розуміння необхідності попередження народження хворих дітей. У більшості азіатських країн, які застосовують ДРТ, не розроблена законодавча і державна політика з цього питання, але винятком є Тайвань. У США відсутнє федеральне законодавство щодо ДРТ, але в кожному штаті існують законодавчі акти, які регулюють окремі позиції [88–94].

В Україні застосування допоміжних репродукційних технологій регулюється наказом Міністерства охорони здоров'я України № 787 від 09.09.2013 року. Наказ забезпечує регулювання відносин між пацієнтами та закладами охорони здоров'я, які забезпечують впровадження технологій ДРТ, визначає механізм та умови застосування вказаних методик. У наказі визначено поняття ДРТ, наведено основні методи, які застосовуються під час лікування ДРТ, позначено показання та протипоказання до ДРТ, встановлено вимоги до закладів, які практикують ДРТ, окреслено умови та порядок процедури донації ембріонів, сперми, ооцитів [100]. З одного боку, існуюче українське законодавство щодо застосування ДРТ робить країну привабливою територією для медичного репродукційного туризму, з іншого — формування концепції репродукційної медицини відповідно до етичних, культурних, релігійних і соціальних традицій та подальше

вдосконалення законодавчої бази необхідно Україні для самоідентифікації як повноцінного учасника Євросоюзу [101].

Таким чином, доцільним є формування стратегії ПГТ та інших досліджень з урахуванням генетичних і соціокультурних особливостей кожної сім'ї, правових та етичних положень країни, технологічних можливостей дослідників, попереднього досвіду колег [83, 87, 102–107].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Збір первинної інформації та лабораторні дослідження проведено у ТОВ «Медичний центр ІГР» (м. Київ) та у його партнерських клініках з 2009 по 2020 рр.

2.1 Матеріали дослідження

Під час роботи використано первинну облікову інформацію пацієнтів, медичну документацію, зразки біологічного матеріалу: венозну кров, еякулят, полярні тілця ооцитів, бластомери ембріонів на стадії 8 бластомерів, клітини TE ембріонів на стадії бластоцисти, рідину бластоцелі ембріонів на стадії експандованої бластоцисти.

Під час оцінювання генетичних та морфологічних характеристик зигот для прогнозування якості ембріонів, які з них сформуються, було проаналізовано показники 352 ооцитів. Проведено ретроспективний аналіз бази даних щодо 69 носіїв транслокацій та 193 ембріонів вказаних осіб. Проаналізовано дані 291 носія транслокацій у програмах ПГТ-А/СП з родин, які мали репродукційні порушення, а саме безпліддя, завмерлі вагітності, невиношування вагітності, спонтанні аборти, азооспермію тощо. Для порівняння результативності різних методів ПГТ-А/СП проаналізовано дані щодо 70 ембріонів, оцінених кількома методами одночасно, та 287 і 365 ембріонів, генетичні характеристики яких було визначено різними методами.

Для з'ясування результатів ПГТ-М проаналізовано інформацію про 1 149 пацієнтів з родин з моногенними патологіями, 4 419 ембріонів, отриманих під час лікування даної групи осіб. Результати одночасного виконання ПГТ-М та ПГТ-А вивчено у 83 родин і 1 054 ембріонів, отриманих у 138 циклах, з яких 320 оцінено за допомогою біопсії бластоцисти в

78 циклах, 670 — за допомогою біопсії бластомера в 56 циклах і 64 — шляхом комбінованої біопсії полярного тільця і біопсії бластоцисти в 4 циклах. За ПГТ-М для оцінки результатів дослідження мутацій *de novo* проаналізовано матеріали 152 родин та 403 ембріонів.

Дослідження проведене відповідно до основних біоетичних норм Хельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення науково-медичних досліджень із поправками (2000, з поправками 2008), Універсальної декларації з біоетики та прав людини (1997), Конвенції Ради Європи з прав людини та біомедицини (1997) та вимог комісії з етики та біоетики медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (протокол № 2 від 9 грудня 2020 р.).

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Дослідження каріотипу. Каріотип пацієнтів аналізували із застосуванням класичних цитогенетичних і молекулярно-цитогенетичних методів, з фарбуванням GTG та CBG. Кров для цитогенетичного аналізу отримували з ліктьової вени, після чого 0,5 мл цільної крові додавали до пробірок, що мали 4,5 мл поживного середовища (PBmax, виробник Gibco, США). Культивування проводили за температури + 37 °C протягом 72 год. Для зупинки мітозу на стадії метафази вводили колcemід (50 мкл на один об'єм середовища). Потім проводили центрифугування і в отриманий осад додавали гіпотонічний розчин (0,075 М хлориду калію) і поміщали в термостат на 20 хв за температури 37 °C. Потім клітини фіксували в трьох змінах охолодженої до 4 °C суміші етанолу з оцтовою кислотою у співвідношенні 3:1, приготованого *ex tempore* (перед використанням). Після остаточного центрифугування та видалення супернатанта, суспензію клітин розкапували на охолоджені вологі скельця та висушували на повітрі. Фарбування препаратів проводили за GTG методом (рис. 2.1) [132–134].

Фарбування препаратів методом GTG (G-метод). Для диференційного забарвлення із застосуванням фарбника Гімза препарати

хромосом поміщали в 0,25 %-й розчин охолодженого трипсину (Gibco, США) на 10–20 с, потім промивали у спиртах 70 °, 80 °, 96 ° не менше 30 с у кожному. Препарати висушували за кімнатної температури. Для фарбування препаратів використовували 5,0 %-й барвник Гімза (Gibco, США), приготований на фосфатному буфері (рН 6,8). Процедура фарбування тривала 5–10 хв. Потім препарати промивали дистильованою водою і висушували на повітрі за кімнатної температури [110, 111] (рис. 2.1).

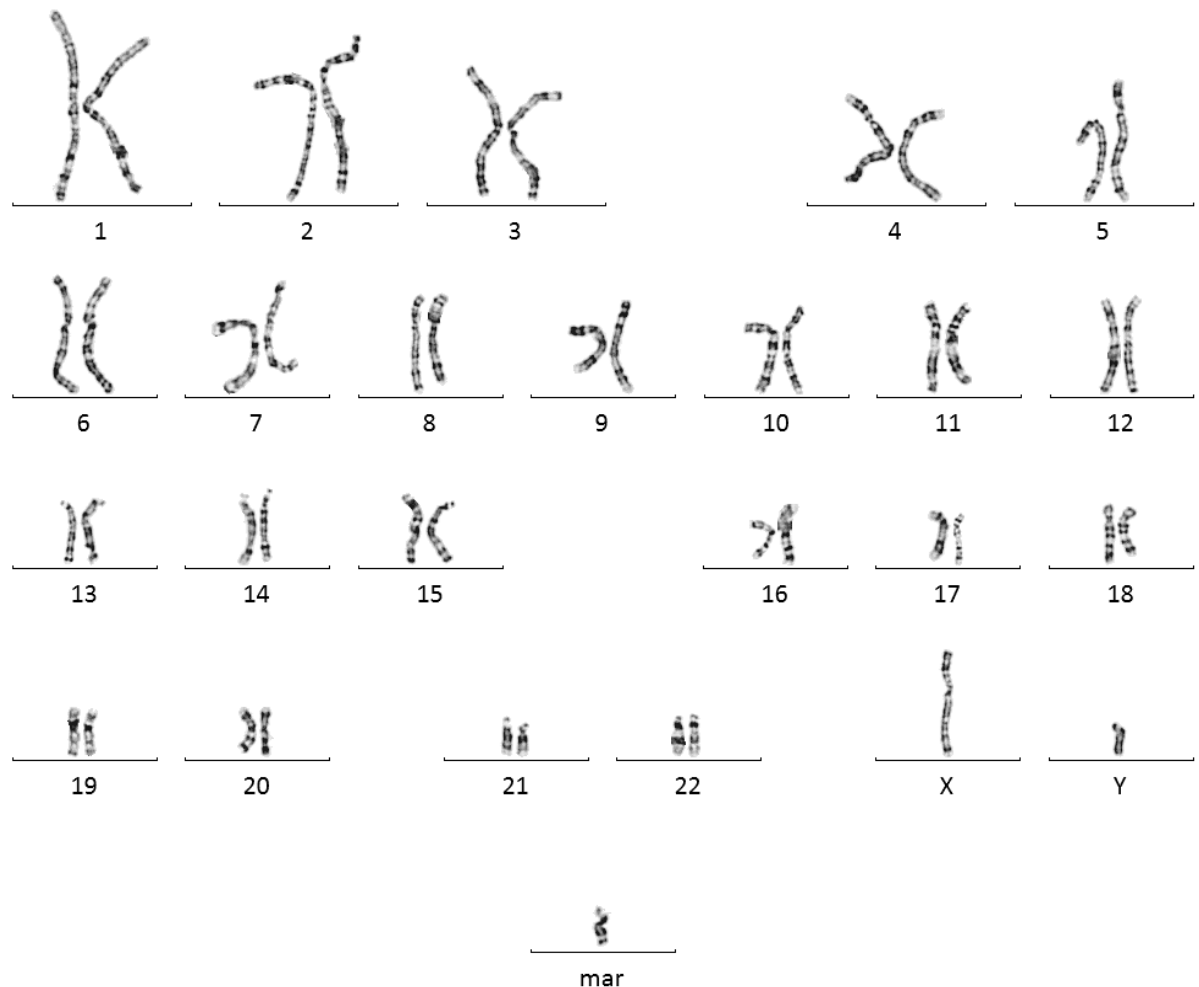


Рис. 2.1. Ідіограма метафазних хромосом, отриманих з лімфоцитів периферичної крові, забарвлених методом GTG (G метод), збільшення 10×100 (ориг.).

2.2.2 Отримання ембріонів для ПГТ. Отримання ооцитів.

Стандартним протоколом для стимуляції суперовуляції як для пацієнток, так і для донорів, є протокол з використанням антагоніста GnRH (gonadotropin-releasing hormone antagonists). У цьому режимі введення уроболіотропіну

(ФСГ) (Fostimon®, IBSA) було розпочато з 2-ї доби циклу, початкові дози складали 150–225 МО/добу. Крім того, вводили антагоніст GnRH з дозуванням 0,25 мг/добу (Cetrotide®, Serono), коли домінуючий фолікул досягав діаметра 14 мм за ультразвукового сканування. Овуляція була індукована агоністом GnRH 0,4 мг (Diphereline®, Beaufour Ipsen International), за умови, що домінуючий фолікул досягав діаметра 20 мм, а рівень естрадіолу (E2) у сироватці відповідав необхідній концентрації. Аспірацію ооцитів здійснювали трансвагінально під контролем ультразвукового дослідження через 36 год після індукції овуляції.

Далі аспіровану фолікулярну рідину продивлялись на наявність ооцит-корона-кумулюсного комплексу (ОКК-комплекс) під стереомікроскопом SMZ-18 (Nikon, Японія) у попередньо нагрітих до 37°C чашках (Oosafe «SparMED», ФРН) діаметром 60 мм. Усі відібрані ОКК-комплекси ретельно відмивали від фолікулярної рідини і крові та переносили до поживного середовища для подальшого культивування.

Для оцінки зрілості, якості та подальшого запліднення оцитів проводили видалення клітин кумулюсу. Процедура проводили через 2 год після отримання яйцеклітин, при цьому їх попередньо занурювали на 20 с в розчин ферменту гіалуронідази, який здатний розчиняти міжклітинний матрикс, який скріплює клітини кумулюсу. Через 30 хв залишки клітин кумулюсу видаляли за допомогою денудаційної піпетки діаметром 140 мкм.

Після ферментативної та механічної підготовки ооцитів, оцінювали ступінь їхньої зрілості за допомогою мікроскопу NIKONTI-U (Nikon, Японія), відповідно до наступних параметрів:

GV (germinalvesicle) — незрілий ооцит, який знаходиться на стадії профазі першого мейотичного поділу. В ооцита відсутнє I полярне тільце, у цитоплазмі візуалізується ядро у вигляді зародкового пухирця.

MI (метафаза I) — незрілий ооцит, який знаходиться на стадії метафази першого мейотичного поділу. Ядро не візуалізується, I полярне тільце ще не виділилось.

МІІ (метафаза ІІ) — зрілий ооцит, який знаходиться на стадії метафази другого поділу мейозу. Наявне І полярне тільце в перивітеліновому просторі.

Мікроманіпуляції ICSI проводили через 4–5 год після трансвагінальної пункції фолікулів для свіжовиділених ооцитів, або через 2 год після розморожування — для кріоконсервованих жіночих гамет [112–115].

Підготовка сперматозоїдів до запліднення. Зразки сперми збирали шляхом мастурбації після трьох діб абстиненції, надалі еякулят залишали розріджуватись протягом 20 хв за кімнатної температури до обробки. По закінченню часу еякулят відмивали у поживному середовищі SupraSperm (Origio, Данія), за допомогою центрифугування протягом 20 хв за 2 000 об./хв вилучали тільки рухому фракцію сперматозоїдів, які надалі і використовували для запліднення ооцитів [116, 117].

Виконання мікрманіпуляції з ін'єкції сперматозоїда у цитоплазму ооцита. Ооцит утримувався на місці за рахунок від'ємного тиску в утримуючій піпетці. Використовуючи два маніпулятори, ооцит повільно обертали для визначення місцезнаходження полярного тіла. Коли екваторіальна площина ооцита була знайдена, утримувальну піпетку було розташовано так, щоб її внутрішній отвір був в цій самій площині, що необхідно для забезпечення кращого утримання ооциту в положенні, протилежному до місця проникнення. Далі ін'єкційну піпетку опускали в екваторіальній площині на 3 год та притискали до блискучої оболонки ооцита щоб почати проникнення, а потім вводили сперматозоїд у положенні на 9 год. При цьому у момент ін'єкції відбувався розрив у мембрані, що супроводжувалося раптовим тремтінням вище і нижче точки проникнення, а також появою проксимального потоку цитоплазматичних компонентів та сперматозоїду назад до піпетки. Через вказаний процес сперматозоїд викидався з цитоплазматичним компонентом. Для того, щоб полегшити активацію ооцитів і запліднення, додаткову цитоплазму відсмоктували назад-вперед ін'єкційною піпеткою, щоб цитоплазматичні компоненти обволікали

сперматозоїд, тим самим спростити сприйняття чоловічої статеві клітини ооцитом [118–120].

Після того, як піпетку витягували, місце входу повинно було підтримувати форму лійки з початком у сторону центру яйцеклітини. Якщо межа цитоплазми ставала вивернутою, цитоплазматичні органели могли просочитися, і ооцит дегенерувати. Після почергового запліднення усіх ооцитів, клітини поміщали у чашки з краплями культурального середовища та розміщували в інкубатори з 5,0 %-м рівнем CO₂ [121].

Оцінювання зиготи: Z-оцінювання. Через 16–18 год після мікроманіпуляцій ICSI оцінювали якість запліднення за наявністю пронуклеусів відповідно до Z-критеріїв за Скоттом. При цьому досліджувався розмір і розміщення пронуклеусів відносно центру клітини, кількість ядерців і їхня локалізація. Розподіл зигот на категорії проводився за наступними критеріями (рис. 2.2): категорія Z1 — пронуклеуси і ядерця мали однаковий розмір і кількість, вони розташовувались полярно; категорія Z2 — пронуклеуси та ядерця мали однаковий розмір, кількість ядерців однакова, ядерця розміщувались рівномірно по всій площині пронуклеусів; категорія Z3 — пронуклеуси мали однаковий розмір, але різну кількість ядерців, різного розміру, розміщувались нерівномірно; категорія Z4 — пронуклеуси розміщувались поза центром цитоплазми, були не з'єднані між собою та відрізнялися за розміром [122–124].

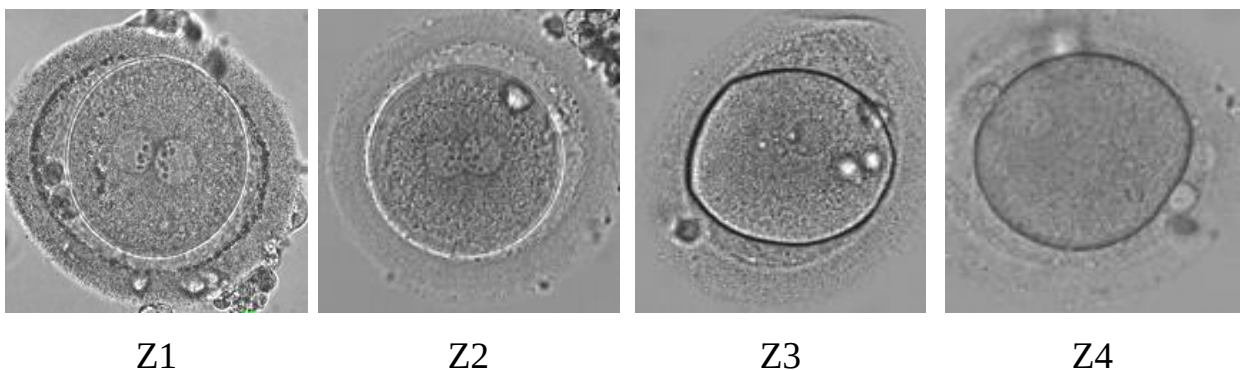


Рис. 2.2. Морфологічні характеристики зигот відповідно до Z-оцінювання за Скоттом, мікроскоп NikonTiEclipse (Nikon, Японія). Збільшення 10×40.

Оцінювання якісних характеристик ембріонів за Гарднером на п'яту добу після запліднення. На п'яту добу після запліднення ооцитів, через 114–118 год, проводилася систематизація наявних ембріонів за їхніми морфологічними характеристиками. При цьому виконували оцінку внутрішньоклітинної маси та ТЕ відповідно до критеріїв якості бластоцисти за Гарднером (рис. 2.3).

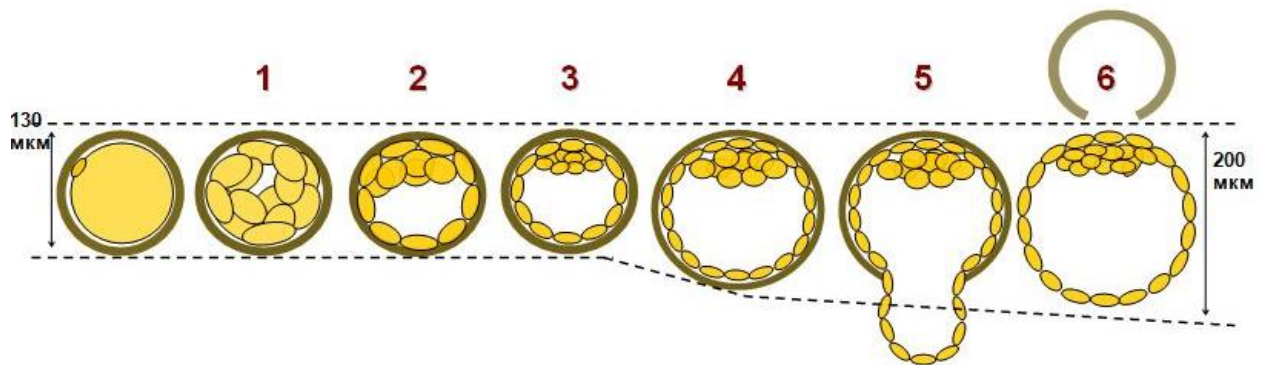


Рис. 2.3. Графічне зображення стадій формування бластоцисти [125].

Ступінь зрілості бластоцисти оцінювали за наступними параметрами:

- 1 — рання бластоциста, формується порожнина, яка займає менше половини об'єму бластоцисти;
- 2 — рання бластоциста, порожнина якої складає більше половини об'єму;
- 3 — повна бластоциста, велика порожнина;
- 4 — розширена бластоциста;
- 5 — бластоциста, клітини якої починають проривати оболонку і виходити назовні;
- 6 — бластоциста повністю вийшла із блискучої оболонки.

Оцінку внутрішньоклітинної маси і ТЕ проводили, починаючи з бластоцист категорії 3.

Внутрішньоклітинна маса:

- A — багатоклітинна, компактна.
- B — некомпактна, малоклітинна.
- C — дуже мало клітин формують внутрішньоклітинну масу.

Трофектодерма:

А — велика кількість клітин.

В — невелика кількість клітин.

С — дуже мало клітин формують трофектодерму [126, 127].

2.2.3 ПГТ ранніх ембріонів. Преімплантаційне генетичне тестування на анеуплоїдії (ПГТ-А) або структурні перебудови (ПГТ-СП) призначалося: у зв'язку з виявленням за каріотипування подружньої пари хромосомних порушень; жінкам старшого репродукційного віку; жінкам з високим фолікулярним резервом; у разі селекції одного ембріона на перенесення з метою виключення багатопліддя; пацієнтам з ризиком успадкування генетичних захворювань, пов'язаних зі статтю; за бажанням пацієнтів. ПГТ щодо моногенних захворювань виконували для визначення генних мутацій, якщо подружжя було носієм мутацій у певних генах.

Біопсія. Перед проведенням забору матеріалу для ПГТ ембріонам розсікали блискучу оболонку за допомогою лазерного пристрою Saturn (Research Instruments, Великобританія). Матеріал для преімплантаційного скринінгу було отримано на третю або п'яту добу після запліднення ооцитів шляхом аспірації однієї клітини (бластомера) ембріона або відсікання 4–5 клітин ТЕ. Біопсія ТЕ вважається менш травматичною для ембріона та інформативнішою за аналіз одиничного бластомера, оскільки матеріал ТЕ дозволяє виявити не тільки анеуплоїдії, а й мозаїцизм (рис 2.4).

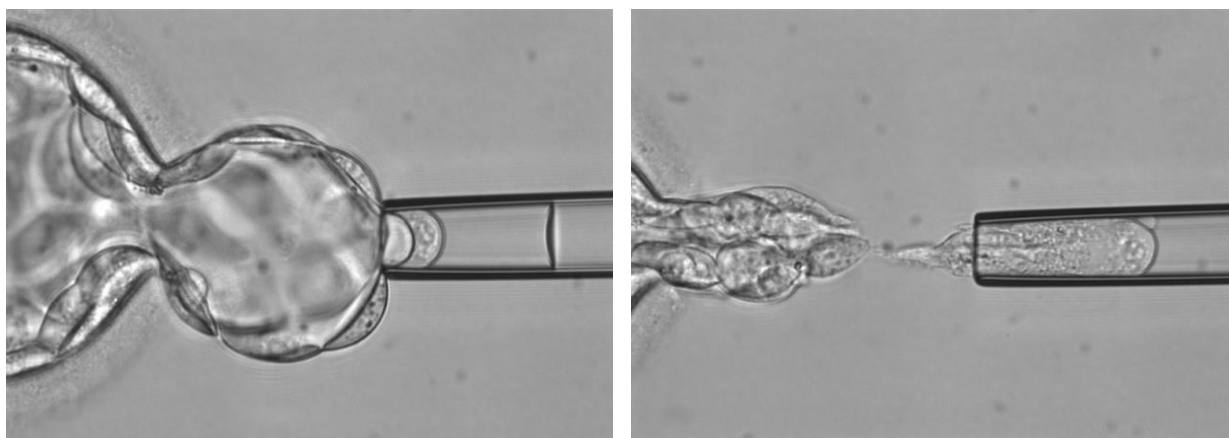


Рис. 2.4. Проведення біопсії бластоцисти з відсіканням кількох клітин ТЕ, мікроскоп Nikon Ti Eclipse (Японія). Збільшення 10×40.

ПГТ-А/СП із застосуванням NGS. Під час дослідження 24 хромосом застосовували метод секвенування наступного покоління з використанням системи напівпровідникового секвенатора Ion S5™ (Thermo Fisher Scientific, США) для виявлення кількісних і структурних порушень хромосомного набору.

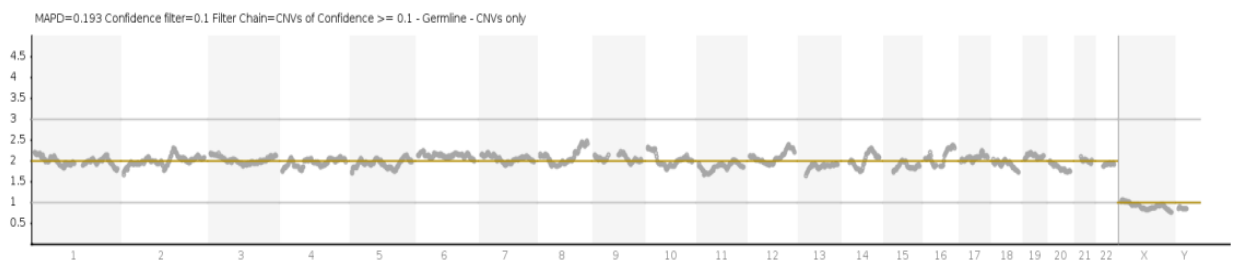
Маніпуляції виконували за протоколами виробника, які включали наступні етапи: виділення ДНК зі зразків, підготовка бібліотеки, проведення емульсійної ПЛР, завантаження чіпа, секвенування та обробка результатів. Після забору матеріалу біоптат ТЕ поміщали у пробірку типу епендорф із 2,5 мкл фосфатного буферу Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Sigma-Aldrich, США). Далі проводили виділення геномної ДНК з отриманих зразків з наступним нагромадженням (ампліфікацією) ДНК, міченням кожного зразка певним баркодом для розпізнавання та з подальшим приготуванням суміші зразків (бібліотеки), що виконували з використанням набору Ion Singleseq Kit на 24 реакції (Thermo Fisher Scientific, США) та ампліфікаторів SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific, США) і Real-TimeCFX96 Touch™ (Bio-Rad, США). Після отримання суміші зразків проводили визначення концентрації бібліотеки за допомогою флуориметра Qubit® 3.0 (Invitrogen/Life Technologies, США) з використанням набору реагентів Qubit® dsDNA HS для кількісного визначення дволанцюгової ДНК та з наступним розведенням суміші до концентрації 100пМ.

Розведену бібліотеку зі сумішшю ферментів вводили до фільтра Ion One Touch™ Reaction Filter (Thermo Fisher Scientific, США), який потім встановлювали у інструмент Ion One Touch™ 2 (Thermo Fisher Scientific, США) для проведення емульсійної ПЛР.

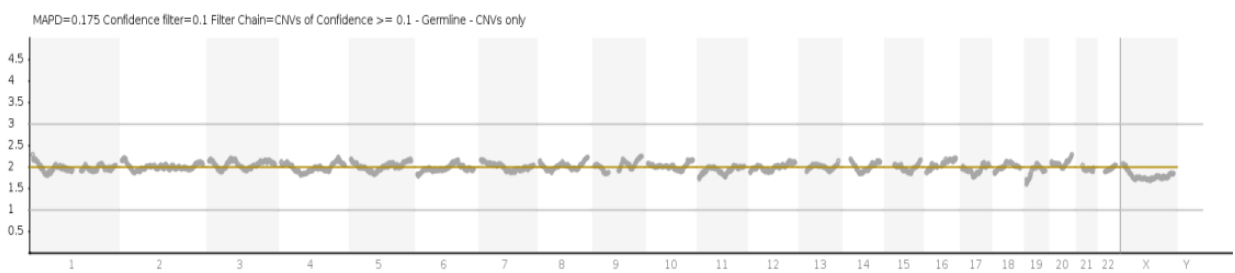
Через 5 год після закінчення реакції отриманий розчин для очищення поміщали в інструмент Ion One Touch™ ES (Thermo Fisher Scientific, США). Після закінчення процесу очищення реакційну суміш із зразками ДНК завантажували у чип Ion 520 Chip (Thermo Fisher Scientific, США) шляхом

введення суміші через порт чипу за допомогою автоматичної піпетки Reference 2 (Eppendorf, Німеччина).

Далі чип встановлювали в гніздо секвенатора нового покоління Ion S5 (Thermo Fisher Scientific, США) та ініціювали процес секвенування ДНК. Через 2 год дані про отримані послідовності автоматично завантажувалися у хмару Thermo Fisher Cloud, де відбувався аналіз секвенованих фрагментів зразків. Результати аналізу (рис. 2.5) були отримані шляхом завантаження файлу із хмарного інтернет-ресурсу Thermo Fisher Cloud через програмне забезпечення Ion Reporter з подальшою інтерпретацією та заключенням генетика відповідно до номенклатури ISCN 2016 (An International System for Human Cytogenomic Nomenclature) щодо хромосомного набору кожного досліджуваного зразка.



а)



б)

Рис. 2.5. Зображення хромосомних профілей ембріонів, отриманих за результатом проведення ПГТ-А методом NGS, **а)** нормальний хромосомний набір, комбінація статевих хромосом відповідає чоловічій статі; **б)** нормальний хромосомний набір, комбінація статевих хромосом відповідає жіночій статі.

ПГТ-А/СП із застосуванням FISH. Отриманий біоптат ТЕ з попередньою обробкою у гіпотонічному розчині (0,075 М хлорид калію) фіксували на склі за допомогою суміші метанолу та оцтової кислоти у співвідношенні 3:1 за методом Мунне.

Наступним етапом було нанесення флуоресцентних ДНК-зондів у зону, де знаходилися ядра клітин з біоптату ембріона. Зазвичай використовували зонди для хромосом 9, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, Y, дослідження яких забезпечують комерційні набори PBMulti Vysion, CepX/CepY, а також Cep9, Cep15, Cep17 (Abbott, США). Скло з нанесеними зондами поміщали до гібридизатора зі встановленою програмою денатурації і гібридизації за температури 37 °C тривалістю від 4 до 12 год.

Потім для видалення негібридизованих проб, а також з метою зменшення крос-гібридизації альфоїдних послідовностей з центромерними ділянками інших хромосом, скло почергово відмивали у розчинах 2xSSC (Abbott, США) за температури 42 °C, дистильованій воді та спиртах 70 ° і 96 ° за кімнатної температури [128, 129].

Далі препарати висушували на повітрі, після чого наносили розчин DAPI-II (Abbott, США) і проводили детекцію флуоресцентних сигналів згідно зі стандартним протоколом та рекомендаціями ESHRE [46].

Мікроскопічний аналіз здійснювали з використанням флуоресцентного мікроскопа Olympus BX 51 (Olympus, Японія), обладнаного відповідним набором фільтрів і програмою автоматичної обробки зображення ISIS (MetaSystems, ФРН) (рис. 2.6).

Перенесення ембріонів здійснювали відповідно до отриманих результатів діагностики на стадії розвитку бластоцисти.

ПГТ-М із застосуванням молекулярно-генетичних методів. Виділення геномної ДНК з отриманих полярних тілець проводили за допомогою лізису одиночних клітин з подальшою нейтралізацією Taq-полімеразним нейтралізаційним буфером; склад буфера для лізису одиночної клітини представлено у табл. 2.1.

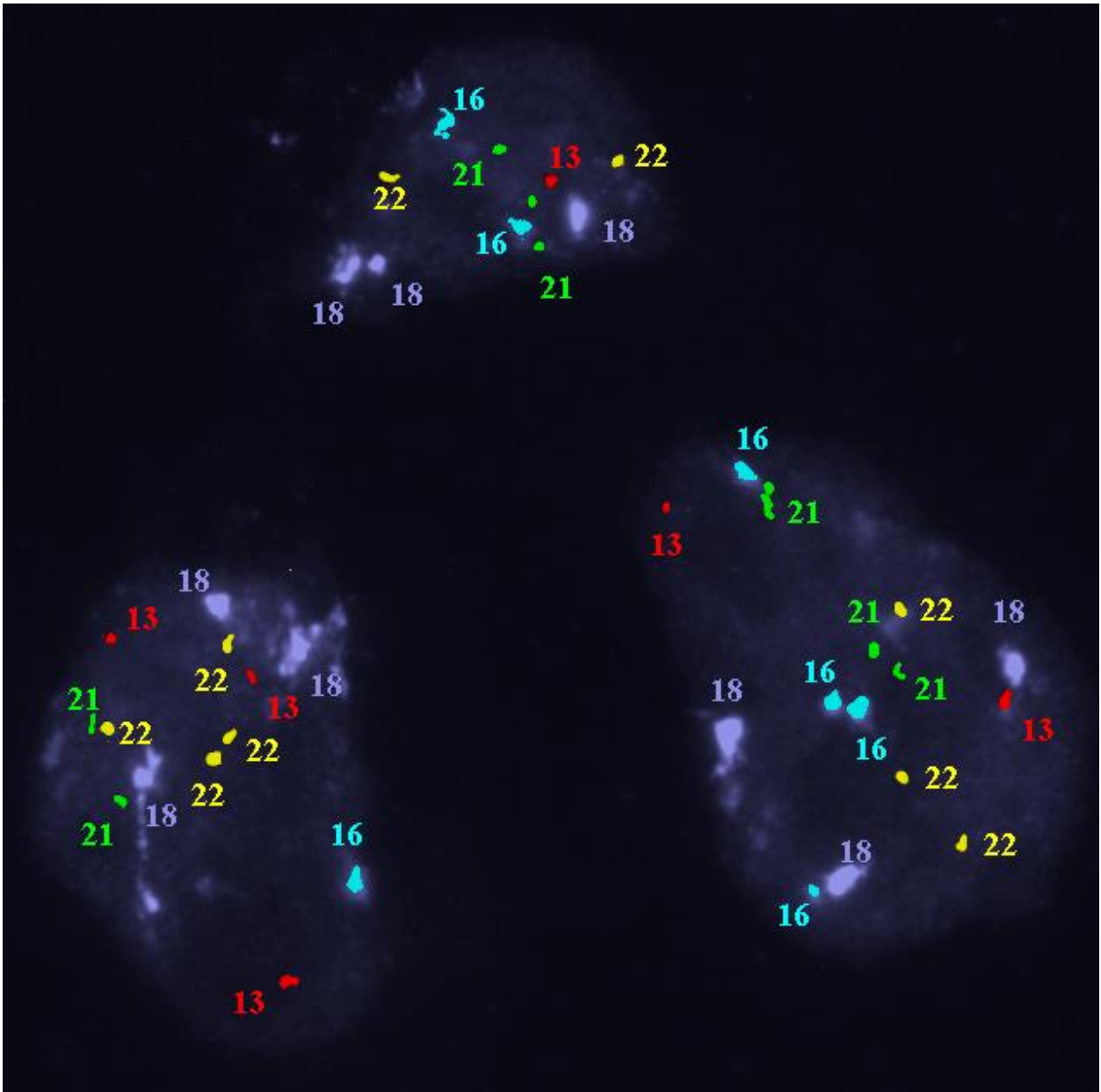


Рис. 2.6. Зображення інтерфазних ядер клітин ТЕ з флуоресцентними мітками хромосом 13, 16, 18, 21, 22, набір MultiVysionPB (Abbott-Vysis, USA), збільшення 10×100 (ориг.).

Для проведення двох-раундової двох-ступінчастої мультиплексної гніздової ПЛР з гарячого старту було використано мастер-мікст 1, 2. Склад майстер-мікст для проведення першого раунду і другого раунду ПЛР представлено в табл. 2.2 та 2.3.

Таблиця 2.1

Склад буфера для лізису одиночної клітини

№	Назва реагенту	Кількість
1	Triton x-100 10 %	1,0 мкл
2	Tween 20 10 %	1,0 мкл
3	Protenase K1 %	1 од.
4	H ₂ O	до 5,0 мкл

Також використано три «позитивних контролі», які містили по 100 пг гомозиготної, яка не відповідала нормі, гомозиготної нормальної і гетерозиготної ДНК.

За можливості як «позитивний контроль» застосовували поодинокі клітини із заздалегідь відомого джерела або культури клітин.

Таблиця 2.2

Майстер-мікст 1 для полімеразної ланцюгової реакції полімерази першого раунду

№	Назва реагенту	Кількість
1	буфер (лізис + нейтралізація)	10,0 мкл
2	Taq-полімераза	0,5–2,5 од.
3	зов. нижній праймер 5' Globin STR	10 мкМ
4	зов. верхній праймер 5' STR	10 мкМ
5	зов. нижній праймер С бета-глобиновой мутации	10 мкМ
6	зов. верхній праймер Д бета-глобиновой мутации	10 мкМ
7	зов. нижній праймер 3' STR	10 мкМ

№	Назва реагенту	Кількість
8	зов. верхній праймер 3' STR	10 мкМ
9	dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	по 10 мкМ
10	Буфер	5,0 мкл
11	MgCl ₂	2,5 мкМ
12	Тритон X-100 1 %	1,0 мкл
13	гліцерин 50 %	1,0 мкл
14	H ₂ O	до 50 мкл

Таблиця 2.3

**Майстер-мікст 2 для полімеразної ланцюгової
реакції полімерази другого раунду**

№	Назва реагенту	Кількість
1	Taq-полімераза	0,5–2,5 од.
2	Зов. верхній праймер	10 мкМ
3	Внутрішній нижній праймер	10 мкМ
4	dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	по 10 мкМ
5	Буфер (50 мМ KCL, 10 мМ TrisHCL, pH 9,0)	5,0 мкл
6	MgCl ₂	2,5 мкМ
7	Тритон X-100 1 %	1,0 мкл
8	Гліцерин 50 %	1,0 мкл
9	H ₂ O	до 50 мкл

Для проведення ПЛР нами було запропоновано системи внутрішніх і зовнішніх праймерів для тестування окремих мутацій гена *HBB* (OMIM

141900), які обумовлюють бета-таласемію, а також зовнішні і внутрішні праймери до двох поліморфних маркерів — 5' Глобин STR і 3' Глобин STR, безпосередньо зчеплених з геном бета-глобіну (LOC - 11 p15.5) (табл. 2.4).

Таблиця 2.4

Послідовності праймерів та умови застосування

Мутація/ПМ	Праймери, нуклеотидна послідовність, (5' --- 3')	Розмір (п. н.)	Ендону- клеаза рестри- кції
1	2	3	4
IVSI – 110 (G > A) (rs35004220)	Зовнішні: CGGCCAATCTACTCCCAGGAG DACATCAAGGGTCCCATAGAC Внутрішні: LHATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGG TT IVSI - 110RCCAGGATCCTAAGGGTGGGAAAATA GAT	597 87	MboI
IVS I – 6 (T > C) (rs35724775)	Зовнішні: C GGCCAATCTACTCCCAGGAG D ACATCAAGGGTCCCATAGAC Внутрішні: N1CAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTA N2GCATCAGGAGTGGACAGATCCCCA	597 363	SfaNI

Продовження табл. 2.4

1	2	3	4
IVS I-1 (G > A) (rs33971440)	Зовнішні: CGGCCAATCTACTCCCAGGAG DACATCAAGGGTCCCATAGAC Внутрішні: N1CAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTA N2GCATCAGGAGTGGACAGATCCCCA	597 363	BspMI
Codon 39 (C > T) (rs11549407)	Зовнішні: C GGCCAATCTACTCCCAGGAG D ACATCAAGGGTCCCATAGAC Внутрішні: LH ATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGTT N2GCATCAGGAGTGGACAGATCCCCA	597 148	MaeI
IVS II – 745 (C > G) (rs63750628)	Зовнішні: THAL1CTAATCTCTTTCTTTCAGG THAL2AACCTTTAATAGAAATTGG Внутрішні: THAL3ATAACAGTGATAATTTCTGG THAL4 ATAACAGTGATAATTTCTGG	454 362	RsaI
5' Глобин STR	Зовнішні: H-1 CCTGATGAGGGTTGAGACAG H-2 CTGCCCCTACCTGGAAAC Внутрішні: H-3 ATAGAGGATCCAGTTTCTTTTG H-4 AGCTCTAACACTCTGAAACTACG	302– 310 102– 110	

1	2	3	4
3' Глобін STR	Зовнішні:	222–	
	ТНО 6 TTCCCAGGCTCTAGCAGC	240	
	ТНО 7 AGCTCCCGATTATCCAGC		
	Внутрішні:	115–	
	ТНО 4AGGGTATCTGGGCTCTGG	131	
	ТНО 5CTTCCGAGTGCAGGTCAC		

Примітки: ПМ — поліморфний маркер

Одночасне визначення двох високополіморфних маркерів 5' Глобін STR і 3' Глобін STR, безпосередньо зчеплених з геном бета-глобіну, доцільно через можливість випадання алеля (ADO) у період тестування мутацій гена *HBB* за ПЛР одиночної клітини. Крім того, визначення кожного з цих високополіморфних маркерів окремо, дозволяє диференціювати наявність або відсутність мутацій гена бета-глобіну. Одночасне проведення дублюючих генетичних аналізів з метою виявлення мутації гена бета-глобіну суттєво знижує ймовірність встановлення помилкового діагнозу і перенесення пацієнтові «проблемного» ембріона.

Ампліфікацію було проведено за наступних умов: 96 °C — 5 хв, 72 °C — 7 хв (гарячий старт), 10 циклів: 96 °C — 20 с, 45 °C — 1 хв 30 с, 72 °C — 20 с; 15 циклів: 95 °C — 20 с, 45 °C — 1 хв, 72 °C — 20 с; 72 °C — 7 хв.

Після проведення ампліфікації продукти ПЛР було оброблено відповідними ендонуклеазами рестрикції за рекомендаціями протоколів виробників.

Після рестрикційного аналізу за наявності мутації IVS 1-110 (G > A) за участі ендонуклеази рестрикції *MboI* з амплікону довжиною 87 п. н. утворювалось два рестрикційних фрагменти: 79 п. н. і 8 п. н, за відсутності

мутації — три рестрикційних фрагменти: 58 п. н., 8 п. н. і 21 п. н. За наявності мутації IVS II-745 (C > G) рестриктаза RsaI розщеплювала амплікон довжиною 362 п. н. на два рестрикційних фрагменти: 242 п. н. і 120 п. н., за відсутності — амплікон залишався цілісним. За наявності мутації IVS I-1 (G > A) рестриктаза BspMI не проявляє своєї активності і амплікон залишається незмінним довжиною 363 п. н. За відсутності мутації IVS I-1 (G > A) рестриктаза BspMI розщеплює амплікон довжиною 363 п. н. на два рестрикційних фрагменти: 211 п. н. і 152 п. н. У разі мутації Codone 39 (C > T) рестриктаза MaeI розщеплювала амплікон довжиною 148 п. н. на два фрагменти: 104 п. н. та 5 і 44 п. н., у разі її відсутності амплікон залишався цілісним довжиною 148 п. н. За наявності мутації IVS1-6 (T > C) після рестрикції амплікону довжиною 363 п. н. за допомогою SfaNI утворювалось три рестрикційних фрагменти: 87 п. н., 185 п. н. і 91 п. н., за відсутності мутації ендонуклеаза рестрикції SfaNI розщеплювала амплікон довжиною 363 п. н. на два фрагменти: 87 п. н. і 276 п. н.

Детекцію результатів рестрикційного аналізу було проведено шляхом візуалізації в 6 %-му поліакриламідному гелі. ПЛР продукти, змішані з фарбою для нанесення зразків, наносили у лунки поруч з маркерами (Gene Ruler DNA Ladder Mix та 50 bp DNA ladder), та довжину ПЛР продуктів у трансільюмінаторі було проаналізовано у порівнянні з довжиною фрагментів маркера.

2.2.4 Програмне забезпечення. Створення баз даних та статистичний аналіз проводили за допомогою пакета програм Microsoft Excel операційної системи Windows XP Professional 1–2 CPU (Microsoft, США), ліцензія № X08-73060. Для обробки зображень цитогенетичних препаратів застосовували програмне забезпечення компанії MetaSystems (ФРН), ліцензія № ISS-0299. Для досліджень стандартними методами цитогенетики використовували програму Ikaros, для молекулярно-цитогенетичних досліджень із застосуванням флуоресценції — програму Isis. Для обробки даних, отриманих за застосування секвенування нового покоління (NGS), первинні

результати секвенування автоматично із апарату Ion S5 надходили до хмарного інтернет-ресурсу Thermo Fisher Cloud, в якому виконувався аналіз даних та формування профілей ембріонів. Визначення наявності мутацій проводили з використанням додатку Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, США).

2.2.5 Статистичний аналіз. Розподіл кількісних даних на відповідність закону нормального розподілу у великих групах ($n > 30$) перевіряли за методом Колмогорова-Смирнова. Для нечисленних груп використовували метод Шапіро-Уїлкі [130]. Порівняння середніх арифметичних виконували методом Стюдента. Різницю частот оцінених параметрів визначали за допомогою кутового перетворення Фішера. Існування зв'язків між ознаками оцінювали методом кореляційного аналізу за Пірсоном та Спірменом. Під час проведення множинних порівнянь в окремих випадках вводили поправку Бонферроні [131]. Статистичні гіпотези перевіряли за допомогою критеріїв t , χ^2 .

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ ДИНАМІКИ РОЗВИТКУ ЕМБРІОНІВ З УРАХУВАННЯМ МОРФОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЗИГОТ

Формування відносини між учасниками репродукційних технологій доцільно планувати з урахуванням генетичних, етнічних, релігійних, культурологічних та юридичних аспектів [88–94].

Оскільки в Україні не існує юридичних перешкод щодо отримання біологічного матеріалу ембріона для ПГТ, та доктрини не усіх релігій та конфесій обмежують ПГТ чи його окремі аспекти, першим етапом роботи було встановлення оптимальної стадії дослідження ембріонів під час їхнього розвитку.

У родинях з обмеженими можливостями отримання ембріонів одним із нагальних питань є проблема підвищення ефективності запліднення *in vitro* і ембріотрансферу для розвитку нормальної вагітності. Робота з ембріонами в рамках ДРТ, залежно від мети, потребує також урахування та розвитку її технологічних аспектів [8, 132–137].

Відомо, що перенесення більше двох ембріонів не збільшує показники вагітності [36, 138, 139], але може підвищити ризик передчасних пологів і перинатальної смерті, особливо у пацієнток літнього віку, коли багато ембріонів переносять для збільшення шансів настання вагітності [140]. Саме тому перехід до перенесення одного ембріона для всіх пацієнтів сприяє пошуку та розвитку можливостей кількісно і якісно оцінювати життєздатність ембріонів [141].

Трансфер одного ембріона передбачає використання морфологічних, генетичних і часових критеріїв під час його вибору. Традиційна морфологічна оцінка дає можливість помірною прогнозування здатності ембріона до імплантації і відрізняється відносно обмеженою специфічністю і чутливістю та суб'єктивністю, і, таким чином, не може бути єдиним об'єктивним

маркером [142, 143], але в той же час є важливою і доцільною для оцінки життєздатності зигот.

Для визначення оптимального часу відбору ембріонів ми проаналізували їхні кількісні та якісні ознаки на різних етапах розвитку (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Параметри розвитку ембріонів у залежності від категорії зигот

Ознака	Z1		Z2		Z3		Z4	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Загальна кількість ооцитів, <i>n</i>	42	100	176	100	124	100	10	100
Кількість ембріонів на 3-тю добу, <i>n</i>	42	100	170	96,6	115	92,8	8	80,0
Середня кількість бластомерів ембріонів на 3-тю 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-ту добу (бластоцист)	29	69,1	123	69,9	77	62,1	2	20,0
Кількість бластоцист якості AA, <i>n</i>	20/29	69,0	7/123	60,9	42/77	54,5	0	0,0
Кількість еуплоїдних ембріонів, <i>n</i>	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	

Примітки: Z1–Z4 — категорії зигот; *n* — кількість; $\bar{x}$ — середнє арифметичне; *s_x* — стандартне відхилення.

Використання Z-оцінювання морфологічних характеристик зигот за Скоттом [122, 123] дало змогу прогнозувати потенціал ембріона якомога раніше та планувати процедури підготовки до ембріотрансферу (рис. 3.1).



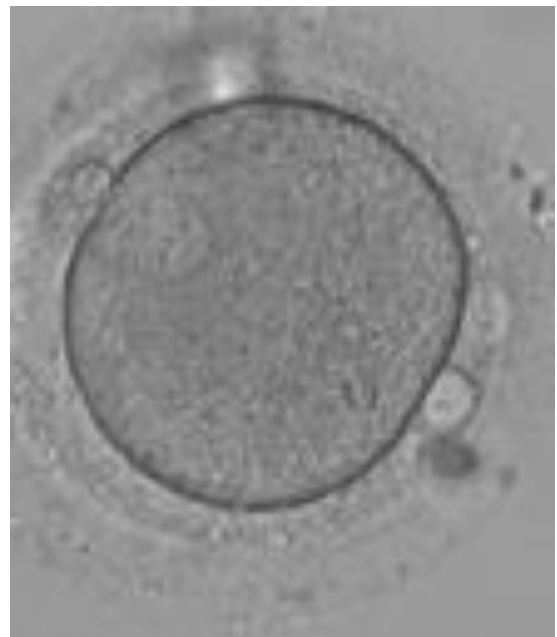
Z1



Z2



Z3



Z4

Рис. 3.1. Зиготи різних категорій за Z-класифікацією Скотта, мікроскоп NikonTiEclipse (Японія). Збільшення 10×40.

Аналіз даних щодо 352 ооцитів з урахуванням категорії зигот показав, що розподіл ембріонів за категоріями на третю добу розвитку значуще не відрізняється 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 розвитку ($p < 0,001$) — найбільшу кількість ембріонів отримано з

зигот категорій Z1 і Z2. Для тих же груп відзначено найбільшу кількість морфологічно якісних бластоцист градації AA — 69,0 % і 60,9 % ($p < 0,001$), відповідно.

Слід зазначити, що хоча найвищий потенціал для імплантації продемонстрували ембріони, які розвивались із зигот категорії Z1, з зигот типу Z2 та Z3 також можливо очікувати формування бластоцист, у тому числі і якості AA, на відміну від запліднених яйцеклітин, які сформували зиготи категорії Z4 без подальшого розвитку.

Оскільки пронуклеарна морфологія зигот може бути пов'язана не тільки зі здатністю до дроблення та можливістю до імплантації ембріонів, але і з показниками еуплоїдності ембріона [144–146], ми проаналізували хромосомні характеристики ембріонів у залежності від категорії зигот. Установлено існування статистично значущого позитивного зв'язку між показниками еуплоїдності ембріонів за дослідженими хромосомами та середньою кількістю бластомерів ембріонів на третю добу ($r = 0,95$, $p = 0,05$) [145–150].

За даними інших науковців [139], поглиблене морфологічне дослідження ембріонів у поєднанні з оцінкою імплантаційного потенціалу кожного класу ембріона дозволяє впроваджувати систему планового перенесення одного ембріона (elective single embryotransfer, eSET), що призводить до прийнятних клінічних результатів і меншої кількості багатоплідних вагітностей у пацієнтів. Але автори зазначають як важливе, що кожна ДРТ-клініка повинна знати про рівень імплантації кожного класу ембріонів у власних умовах, тому ми провели дослідження за власними даними. За нашими результатами, понад 30 % ембріонів у кожній із Z1–Z3 груп зупиняються у розвитку до стадії бластоцисти.

За даними літератури, незалежно від якості ембріонів, звичайним явищем на стадіях дроблення є мозаїцизм, якій може спостерігатися у трьох чвертей ранніх ембріонів [151–153]. Висока частота диплоїдно-анеуплоїдних мозаїків, які містять еуплоїдні клітини, є також аргументом на користь більш

ефективного тестування ембріонів на стадії бластоцисти, коли мозаїцизм можна очікувати, за даними [154] на нижчих рівнях, 3,9–33 %.

Таким чином, за відсутності юридичних і релігійних обмежень щодо отримання біологічного матеріалу ембріонів для проведення ПГТ, дослідження ембріонів доцільно проводити на п'яту добу розвитку, коли можливість відбору життєздатних ембріонів, які походять із зигот категорій Z1–Z3, вища, а ймовірність пошкодження ембріона — нижча. Оцінка якості зиготи за морфологічними критеріями важлива не тільки для прогнозу розвитку ембріона, але й для планування типу протоколу стимуляції суперовуляції. Особливо це стосується родин, в яких можливість отримання ембріонів або їхня кількість та якість є обмеженими.

Публікації за темою розділу дисертації:

1. Ilyin 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*).

2. 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 доп. XV міжнар. наук. конф. студ., мол. вчених та фахівців, Харків, 25–26 квіт. 2018 р.* Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2018. С. 72–73.

3. 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 доп. XIV міжнар. наук. конф. студ., асп., докт., мол. вчених та фахівців, Харків, 30–31 бер. 2017 р.* Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2017. Т. 2. С. 71–74.

4. 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 доп. XVI міжнар. наук.-практ. конф., Харків, 28–29 бер. 2019 р.* Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2019. С. 74–75.

5. 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 доп. XV міжнар. наук. конф. студ., мол. вчених та фахівців, Харків, 25–26 квіт. 2018 р.* Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2018. С. 49–51.

6. **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 доп. XIV міжнар. наук. конф. студ., асп., докт., мол. вчених та фахівців, Харків, 30–31 бер. 2017 р.* Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2017. Т. 2. С. 74–76.

РОЗДІЛ 4

ТРАНСЛОКАЦІЇ І ПРЕІМПЛАНТАЦІЙНЕ ГЕНЕТИЧНЕ ТЕСТУВАННЯ АНЕУПЛОЇДІЙ/СТРУКТУРНИХ ПЕРЕБУДОВ

4.1 Визначення генетичних особливостей носіїв транслокацій з родин, що потребують ДРТ

Особи з хромосомними аномаліями, зокрема зі збалансованими транслокаціями, є одною з найбільш поширених та інтернаціональних категорій пацієнтів, які звертаються до ДРТ. Носійство транслокацій є проблемою, під час якої можливо попередити репродукційні втрати або народження хворих нащадків. Саме тому важливо розуміти, які біологічні та соціальні особливості необхідно врахувати під час планування ПГТ у родинх носіїв транслокацій. Серед ознак, які можуть вплинути на параметри та життєздатність ембріонів, у першу чергу доцільно розглянути статеві вікові характеристики носія, особливості хромосомних перебудов залучених хромосом.

4.1.1 Цитогенетичні характеристики носіїв транслокацій. Ретроспективний аналіз даних клініки ТОВ «Медичний центр ІГР» показав, що серед осіб, які зверталися по допомогу з приводу порушення репродукційної функції ($n = 6156$), а саме — безпліддя, завмерлі вагітності, невиношування вагітності, спонтанні аборти, азооспермію і інші, 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 % ($n = 23$) [155]. Таке співвідношення подібно даним літератури, наприклад за дослідженнями латвійських колег, в описаній ними вибірці пацієнтів-носіїв реципрокних транслокацій було в 4,5 раза більше, ніж носіїв робертсонівських [156]. Аналіз хромосом, залучених у робертсонівські транслокації, показав не випадковий характер розподілу залучених хромосом — участь хромосоми 14 було визначено у 82,6 % транслокацій

($p < 0,001$) [155]. Найчастіше серед робертсонівських транслокацій було виявлено дериватну хромосому $\text{der}(13; 14)$ — 60,9 % від кількості усіх аналізованих дериватних хромосом, що зіставно з даними інших українських авторів — 63,6 % [157], згідно з якими наявність такої хромосомної патології обумовлює порушення гаметогенезу. 8,7 % припало на транслокації $\text{der}(14; 14)$, $\text{der}(14; 15)$, $\text{der}(14; 22)$, $\text{der}(13; 15)$ і 4,3 % — на $\text{der}(14; 21)$. Оскільки спектр реципрокних транслокацій істотно ширший, ними представлено не менше половини збалансованих аутосомних перебудов [158], які визначаються в людських популяціях, і частка ембріонів із незбалансованими транслокаціями від батьків-носіїв вища, ніж за інших хромосомних перебудов [156, 159], ми сфокусували увагу на дослідженні особливостей реципрокних транслокацій в родинах, залучених до програм ПГТ-А/СП.

Отримані популяційні показники можна порівняти за даними мета-аналізу, представленою ще в 1990 році Ф. Фогель і А. Мотульські ($n = 17\,202$) [160], за якими частота гетерозиготного носійства реципрокних транслокацій серед дорослих людей становить 0,639 на 1 000 осіб, або 0,06 %; серед осіб з репродукційними порушеннями — безпліддям і звичним невиношуванням — 0,2–1,7 %. За даними В. С. Баранова та Т. В. Кузнецової (2007), цей показник склав 1 на 600 подружніх пар, або 0,08 % [158]. Представлені С. S. Paththinige et al. (2019) результати аналізу вибірки пацієнтів ($n = 15\,864$) також показали зіставну частоту транслокацій — 1,7 %, співвідношення робертсонівські/реципрокні — 57,8/42,2 % [161]. У США частота збалансованих транслокацій серед населення у теперішній час оцінюється як 1:500 [162], або 0,2 %. Таким чином, протягом останніх 30 років частота гетерозиготного носійства реципрокних транслокацій серед дорослих осіб у різних країнах склала 0,06–0,2 %, і можна очікувати такого ж показника для населення України.

У носіїв реципрокних транслокацій у нашому дослідженні в обмінні були залучені усі хромосоми, так само, як представляють і інші дослідники [163]. У той же час розподіл їхніх частот статистично значуще відрізняється від рівноймовірного ($p = 0,03$) (табл. 4.1). У вибірці носіїв транслокацій ($n = 46$) найчастіше в такі перебудови залучені хромосоми 1, 2, 11, 14, 15.

Розподіл залученості різних хромосом в реципрокні транслокації

Хромо- сома	Показник залучення хромосом в реципрокні транслокації, %		Показник розподілу ембріонів залежно від хромосом, залучених в реципрокні транслокації батьків, %	
	У загальній вибірці носіїв ($n = 46$) *	У вибірці батьків ($n = 16$) ембріонів**	Усіх ембріонів, %	Еуплоїдних зі збалансованими транслокаціями***, %
1	2	3	4	5
1	9,6	9,4	7,8	6,7
2	8,6	15,6	20,7	17,5
3	3,2	6,3	8,5	15,2
4	4,3	0	0	0
5	5,4	3,1	3,6	21,2
6	4,3	3,1	2,3	11,1
7	5,3	6,3	4,9	10,5
8	4,3	0	0	0
9	2,2	3,1	2,3	0
10	1,1	0	0	0
11	9,6	15,6	9,5	5,4
12	4,3	3,1	3,4	15,4
13	2,2	0	0	0
14	7,5	3,1	2,8	18,2
15	6,4	0	0	0
16	2,2	3,1	2,6	0
17	4,3	3,1	2,3	0
18	1,1	0	0	0

1	2	3	4	5
19	2,2	6,3	8,5	15,2
20	3,2	6,3	9,3	13,9
21	1,1	3,1	3,4	15,4
22	4,3	9,4	7,8	10,0
X	2,2	0	0	0
Y	1,1	0	0	0

Примітки:* — розподіл частот статистично значуще відрізняється від рівномірного, $p = 0,03$; ** — розподіл частот статистично значуще відрізняється від такого у загальній вибірці, $p = 0,0003$; ***— від усіх ембріонів у групі кожної хромосоми; n — кількість.

Ці результати (табл. 4.1) [155] зіставні з сучасними даними інших авторів щодо показників залученості у реципрокні транслокації хромосом 1, 8, 11, 19, 20, X, Y — 9,0 %, 7,3 %, 7,7 %, 2,1 %, 1,3 %, 1,5 %, 0,5 % [161] ($p = 0,65$).

Аналіз вибірки носіїв транслокацій ($n = 291$) показав, що найчастіше в обміни були залучені хромосоми 2, 3, 5, 11, рідше — 16, 17, 19, 20, 22, X. У той же час розподіл показників залученості більшості хромосом до збалансованих перебудов зіставний, так само, як і в обох вибірках між собою ($p = 0,06$).

Можлива участь у збалансованій хромосомній перебудові будь-якої з аутосом чи статевих хромосом робить актуальним аналіз всіх хромосом у першу чергу за каріотипування потенційних батьків [164]. Також корисним було б визначити типи хромосомних перебудов, пов'язані зі зниженням можливості отримання еуплоїдних ембріонів, збалансованих за транслокацією, в умовах країни, регіону та центру, та рекомендувати врахувати під час вибору технологічних та клінічних протоколів. Для такого

цитогенетичного аналізу ми застосовували методи диференційного забарвлення хромосом, наприклад, GTG (Giemsa stain), та інші [165], що дозволяє оцінити особливості структури всіх хромосом.

4.1.2 Термін розвитку ембріонів під час аналізу і їхні кількісні та якісні характеристики. Аналіз даних пацієнтів з родин, у яких отримані тестовані ембріони, показав, що у батьків з робертсонівськими транслокаціями (30,4 %) найбільшу частку серед усіх транслокацій такого типу також склала дериватна хромосома der (13; 14), — 85,7 %.

У носіїв реципрокних транслокацій — батьків ембріонів, досліджених на п'яту добу розвитку, розподіл показників участі окремих хромосом ($p = 0,0003$, табл. 4.1) та хромосом груп A-G ($p < 0,001$, табл. 4.2) у транслокаціях значуще відрізнявся від таких у загальній групі осіб-носіїв реципрокних транслокацій, що може бути наслідком тиску відбору проти окремих хромосомних наборів, а саме — наслідком особливостей мейозу батьків, презиготичної селекції гамет, диференційної життєздатності ембріонів [166].

Згідно літературних даних [159], за результатами дослідження 359 циклів ПГТ щодо структурних перебудов із використанням методу порівняльної геномної гібридизації, автори визначили статистично значущу більшу частку аномальних ембріонів на третю добу розвитку у порівнянні з ембріонами на п'яту добу. За результатами Beyer C. E., Willats E. (2017), аналіз схем сегрегації хромосом у носіїв реципрокних транслокацій та дослідження ембріонів на третю та на п'яту–шосту доби показали, що за різних моделей сегрегації хромосом спостерігається різна здатність до розвитку ембріонів протягом вказаного періоду — на третю добу відмічено 22,3 % ембріонів зі збалансованими транслокаціями, на п'яту–шосту — 53,1 % [167]. Для ембріонів, досліджених на третю добу, отриманих від жінок, молодших 36 років, показники анеуплоїдії становили 50,7 % для носіїв реципрокних і 49,1 % — для носіїв робертсонівських транслокацій, в контрольній групі — 44,8 %. У ембріонів, досліджених на п'яту добу, від

жінок такої ж вікової групи показники анеуплоїдії становили 24,5 % для носіїв реципрокних і 34,9 % для носіїв робертсонівських транслокацій [163].

Отримані нами дані показали, що серед ембріонів, досліджених на п'яту добу, ембріони зі збалансованими транслокаціями склали 20,7 % від усіх, отриманих від батьків з реципрокними транслокаціями, що збігається з даними інших дослідників, та еуплоїдні ембріони зі збалансованими хромосомними перебудовами склали 13,0 % від загальної кількості.

Оскільки літературні та власні показники ілюструють дію природного відбору на користь нормальних або збалансованих хромосомних наборів, доцільним, на нашу думку, є проведення ПГТ ембріонів щодо структурних перебудов на п'яту добу розвитку, тим більше, що саме на стадії бластоцисти ембріон потрапляє в матку у природному циклі.

4.1.3 Участь різних хромосом у транслокаціях батьків, інтерхромосомний ефект і кількісні та якісні характеристики ембріонів.

Ми проаналізували цитогенетичні особливості транслокацій батьків, які можуть бути предикторами збалансованих транслокацій у ембріонів та характеристики хромосом для оцінки впливу типу і масштабів хромосомного дисбалансу на розвиток ембріонів. Можливо очікувати, що більший дисбаланс буде приводити до ранньої загибелі зигот та ембріонів, помірний — до пізнішої.

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, майже на порядок менше — для хромосом груп В та D — 3,6 %–2,9 % ($p < 0,001$) (табл. 4.2).

Визначення часток еуплоїдних ембріонів зі збалансованими хромосомними наборами показало нерівномірний розподіл показника у різних групах хромосом батьків ($p = 0,0008$) — найвищі значення спостерігаються для ембріонів від батьків із транслокаціями хромосом груп В та D — 21,4–18,2 % (табл. 4.2) [166].

Розподіл залученості різних груп хромосом у реципрокні транслокації

Група хромосом	Показник залучення хромосоми в реципрокні транслокації, %		Показник розподілу ембріонів залежно від груп хромосом, залучених в реципрокні транслокації батьків, %	
	У загальній вибірці носіїв ($n = 46$)	У вибірці батьків ($n = 16$) ембріонів*	Усіх ембріонів, %	Еуплоїдних зі збалансованими транслокаціями **, %
A	21,5	31,3	37,0	14,7
B	9,7	3,1	3,6	21,4
C	33,3	31,3	22,5	8,0
D	16,1	3,1	2,9	18,2
E	7,5	6,2	4,9	0
F	5,4	12,5	17,9	14,4
G	6,5	12,5	11,2	16,3

Примітки: * — розподіл частот статистично значуще відрізняється від такого у загальній вибірці, $p = 0,001$; ** — від усіх ембріонів у кожній групі хромосом; n — кількість.

Життєздатність ембріонів може залежати від порушення початку експресії генів, розташованих в зонах хромосом, які беруть участь у транслокації, що може вплинути на розвиток ембріона на будь-якому етапі.

Найбільший показник щодо euploidних ембріонів зі збалансованими хромосомними наборами визначено у групі метацентричних-acroцентричних хромосом — 18,8 %, що статистично значуще вище, ніж в окремих інших групах, наприклад, у групі субметацентричних-субметацентричних хромосом — 18,8 % у порівнянні з 5,6 % ($p < 0,05$) (табл. 4.3).

**Аналіз характеристик ембріонів за різних комбінацій хромосом,
залучених у реципрокні транслокації батьків**

Хромосоми	N	N1	Ембріони зі збалансованими транслокаціями, %			Ембріони з незбалансованими транслокаціями, %		
		$\bar{x} \pm s_x$	еупло-їдні	анеу-плоїдні	разом	еупло-їдні	анеу-плоїдні	разом
Метацентрична-Метацентрична	69	17,3±3,8	14,3	7,4	21,7	21,7	56,6	78,3
Субметацентрична-Субметацентрична	18	9,0±0,0	5,6*	5,6	11,2	11,1	77,7	88,8
Метацентрична-Акроцентрична	32	16,0±7,1	18,8*	6,2	25,0	3,1	71,9	75,0
Субметацентрична-Акроцентрична	22	7,3±5,1	13,6	4,6	18,2	27,3	54,5	81,8
Метацентрична-Субметацентрична	52	10,4±2,7	9,6	11,5	21,1	17,4	61,5	78,9

Примітки: N — кількість досліджених ембріонів від батьків-носіїв транслокацій різних хромосом; N1 — кількість ембріонів на цикл; $\bar{x}$ — середнє арифметичне; s_x — стандартне відхилення, * — $p < 0,05$.

Розподіл часток ембріонів вказаного типу за проаналізованими комбінаціями хромосом батьків показав різницю між ними на рівні $p = 0,08$ [168].

За даними інших авторів, співвідношення відносних розмірів переміщених сегментів обох залучених у транслокацію хромосом може дати уявлення про ймовірність нормального хромосомного набору ембріонів —

дуже асиметричні транслокації мають більший ризик незбалансованих продуктів. У той же час, на думку авторів, розташування точки розриву хромосоми та відносні розміри сегмента хромосоми, залученого у транслокацію, не впливають на прогнози щодо відсотка ембріонів зі збалансованими варіантами [169].

У нашому дослідженні анеуплоїдні ембріони склали 70 % від усіх отриманих. Серед ембріонів зі збалансованими транслокаціями частка анеуплоїдних склала 37,5 %. Багатьма авторами також відмічено загальний інтерхромосомний ефект, коли спостерігається висока частка ембріонів з кількісними аномаліями за хромосомами, які не беруть участь у перебудові [159].

Крім того, для ембріонів, досліджених як на третю, так й на п'яту добу розвитку, ризик хромосомних численних відхилень від норми спостерігався для кожної з 22 пар аутосом чи статевих хромосом. Транслокації за участю Х-хромосоми можуть призвести до ще більшої варіабельності результату через її інактивацію, яка може включати і аутосому, залучену в транслокацію [163].

Таким чином, участь в перебудові будь-якої з хромосом та наслідки інтерхромосомного ефекту у вигляді чисельних змін у хромосомному наборі ембріона є вагомим аргументом на користь ПГТ-А/СП, аналізу 24 хромосом під час ПГТ ембріонів для підвищення ефективності визначення як транслокацій, так і анеуплоїдій. До того ж ПГТ-А/СП доцільно проводити методами, які дозволяють провести аналіз відносно швидко, наприклад, у нашому випадку це був метод секвенування нового покоління. Порівняльна геномна гібридизація також може підтвердити відсутність делеції або дуплікації навколо точок розриву хромосоми, хоча і не ідентифікує пошкодження гена.

4.1.4 Стать батьків-носіїв транслокації і кількісні та якісні характеристики ембріонів. Співвідношення чоловіків і жінок серед осіб з реципрокними транслокаціями в нашому дослідженні склало 1:1,3 ($p =$

0,238). Носії реципрокних транслокацій обох статей зіставні за віком на момент обстеження, за кількістю ембріонів на цикл. У той же час серед осіб, від яких були отримані і проаналізовані ембріони на п'яту добу розвитку, співвідношення чоловіків і жінок склало 3:1 ($p = 1$). Наші результати узгоджуються з даними E. Mateu-Brull et al. (2019), згідно яких частота вагітностей, які успішно розвивалися, була вищою в групах, де носієм транслокації був чоловік [159]. У вибірці осіб зі зниженою фертильністю, описаній C. S. Paththinige et al. (2019), співвідношення чоловіків і жінок склало 41,9:58,1 [161]. За даними В. С. Баранова та Т. В. Кузнецової, хромосомні перебудови у жінок відзначаються у два рази рідше, ніж у чоловіків, але автори зазначають, що і матері, і батьки, гетерозиготні за реципрокними транслокаціями, мають подібну частоту незбалансованих каріотипів у плодів і новонароджених [158].

Згідно наших результатів, рівень еуплоїдності усіх ембріонів від матерів і батьків, носіїв реципрокних транслокацій, був зіставним — 28,6 % та 30,6 %, відповідно, так само, як і рівень еуплоїдії ембріонів, збалансованих за транслокацією — 14,3 % від матерів-носіїв і 12,5 % від батьків. У той же час, встановлено статистично значущу різницю між матерями та батьками-носіями у співвідношенні ембріонів зі збалансованими та незбалансованими транслокаціями. Від матерів їх отримано у відношенні 1:2,8, від батьків — 1:4,3 ($p = 0,049$). Окремі наші показники збігаються з даними латвійських авторів, згідно яких найвищий рівень еуплоїдності відзначено в групі чоловіків-носіїв — 26,7 %, хромосомні аберації, пов'язані з транслокацією, були найвищими в групі жінок-носіїв — 77,8 % [168]. Ембріони від жінок-носіїв мали найнижчий рівень еуплоїдності, рівень незбалансованих транслокацій в 4,7 рази вищий, ніж в групі чоловіків-носіїв, і більш високі показники загальної анеуплоїдності [156]. За даними літератури відомо, що існують відмінності мейозу у чоловіків і жінок за швидкістю і локалізацією обмінів хромосом, за їхнім ступенем і напрямком [170–174], тому вони можуть бути основою не тільки гаплоїдного [175], або гаметного відбору, але

і відбору ембріонів. Аналіз наших результатів щодо клінічних вагітностей і народжених здорових дітей після ПГТ-А/СП показав, що здорові нащадки народились 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 під час планування ПГТ-А/СП.

4.1.5 Вік батьків-носіїв транслокації і кількісні та якісні характеристики ембріонів. Аналіз, проведений з урахуванням віку батьків-носіїв реципрокних транслокацій показав, що існує зворотній зв'язок показників віку та кількістю отриманих ембріонів ($r = -0,48$, $p = 0,02$). Установлена також зворотна залежність між віком батьків і кількістю еуплоїдних ембріонів, як зі збалансованим хромосомним набором ($r = -0,68$, $p = 0,0003$), так із незбалансованим ($r = -0,60$, $p = 0,02$) [166]. За даними літератури відомо, що за підвищення материнського віку вище 36 років у носіїв реципрокних транслокацій показники анеуплоїдії у ембріонів, досліджених на п'яту добу розвитку, збільшувалися в 2,5 рази [163]. Але італійські дослідники встановили, що у той час, як було підтверджено вікову залежність анеуплоїдій, жодна зі структурних аномалій хромосом не показала вікових відмінностей [176]. Нами ж визначено статистично значущий від'ємний зв'язок між віком батьків і загальною кількістю ембріонів зі збалансованими реципрокними транслокаціями ($r = -0,53$, $p = 0,01$).

Представлені в літературі результати досліджень з різних країн на перший погляд досить суперечливі. Наприклад, за даними [163], при віці матерів до 36 років у ембріонів на п'яту добу розвитку показники анеуплоїдії становили 24,5 %, в контрольній групі — 53,6 %. За результатами інших дослідників [156], середня частота анеуплоїдності ембріонів, отриманих від носіїв транслокацій буде вищою, ніж у людей з нормальним каріотипом. Розбіжності, на наш погляд, в оцінці та інтерпретації отриманих результатів у різних груп дослідників також можуть бути пов'язані не тільки з різним дизайном дослідження і методологічним підходами, але і з генетико-

демографічними особливостями населення, що робить актуальним отримання і аналіз генетичних даних в кожній країні.

Оскільки встановлені статеві-вікові особливості мейозу у різних груп організмів, у тому числі й у людини [170–174], можна припустити, що особливості рекомбінаційних процесів під час мейозу у носіїв транслокацій обумовлюють зниження кількісних та якісних показників ембріонів із підвищенням віку батьків, що важливо врахувати під час планування ПГТ.

4.1.6 Сегрегация транслокацій в мейозі батьків і кількісні та якісні характеристики ембріонів. Теоретично очікувані показники частоти транслокацій на різних етапах онтогенезу людини відрізняються від емпіричних, що може бути зумовлено біологічними і соціальними причинами. Можлива різна частота звертань до ДРТ чоловіків і жінок, носіїв реципрокних транслокацій, оскільки презиготична селекція гамет у чоловіків, ймовірно, частіше дозволяє отримати успішну вагітність в природних циклах. Також розбіжність фактичних і теоретичних даних пов'язана не тільки з особливостями мейотичної сегрегації хромосом і з відбором проти гамет, ембріонів, плодів з аномальним каріотипом, а й з технічними складнощами детекції різних варіантів хромосомного дисбалансу. Відомо, що частка гамет кожного типу, які утворюються за мейотичної сегрегації хромосом, варіює. При цьому частота незбалансованих за транслокаціями варіантів може складати 18–82 % [177]. За даними українських колег, у чоловіків з реципрокними транслокаціями альтернативний тип сегрегації хромосом в гаметогенезі становить 41,5 %, частота гамет з незбалансованими транслокаціями в середньому 58,5 % [178]. При цьому за морфологічними критеріями сперматозоїди з незбалансованими сегрегаційними варіантами зазвичай не відрізняються від нормальних гамет [9, 178], що може бути однією з причин зниження тиску відбору проти аномальних статевих клітин у чоловіків, у тому числі і у рамках ДРТ. У той же час вважається, що частка сперматозоїдів з незбалансованими транслокаціями зазвичай нижча, ніж

ооцитів з незбалансованими сегрегаційними варіантами, завдяки особливостям контролю етапів клітинного циклу у чоловіків [177].

Проведений нами аналіз результатів дослідження ембріонів на п'яту добу розвитку з різними генетичними характеристиками показав, що ембріонів зі збалансованими реципрокними транслокаціями в 3–4 рази менше ($p < 0,001$), ніж з незбалансованими (табл. 4.4), які склали 73,5–81,2 % від усіх отриманих. Співвідношення ембріонів нормальних і з незбалансованими транслокаціями залежить від термінів біопсії і може становити 63:36 % [179], оскільки ембріони з незбалансованими варіантами частіше зупиняються в розвитку до стадії бластоцисти.

Таблиця 4.4

**Генетичні характеристики ембріонів
від батьків-носіїв реципрокних транслокацій**

Стать	N	Кіль- кість ембрі- онів (на цикл)	Ембріони зі збалансованими транслокаціями						Ембріони з незбалансованими транслокаціями					
			на цикл				%	на цикл				%		
			еупло- їдні		анеупло- їдні			еупло- їдні		анеупло- їдні				
			$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	n	$\bar{x} \pm s_x$		n	$\bar{x} \pm s_x$	N	$\bar{x} \pm s_x$		n	
Жін	49	12,3±5,9	1,8± 1,7	7	1,5± 1,3	6	26,5	1,8± 0,9	7	7,3± 4,6	29	73,5		
Чол	144	12,0±5,3	1,5± 1,2	18	0,8± 0,9	9	18,8	2,2± 2,4	26	7,6± 2,9	91	81,2		

Примітки: N — кількість досліджених ембріонів; Стать — стать батька-носія транслокації; n — кількість; $\bar{x}$ — середнє арифметичне; s_x — стандартне відхилення.

За даними літератури, дослідження за виконання біопсії на стадії дроблення інші автори виявили близько 82 % ембріонів з незбалансованими транслокаціями [180], за біопсії TE на стадії бластоцисти — 52–67 % [179, 181].

Ми проаналізували фактичні частоти утворення ембріонів з різними генетичними характеристиками. Ембріони зі збалансованим хромосомним набором, які є результатом альтернативної сегрегації транслокаційного квадрівалента під час мейозу, від носіїв транслокації матерів і батьків, склали 14,3 % і 12,5 %, у середньому — 13,0 % у випадку їхньої еуплоїдності.

Установлено наявність ембріонів зі збалансованими варіантами, але анеуплоїдних за іншими хромосомами, 12,2 % — у матерів і 6,3 % — у батьків, 7,8 % — у середньому. У той же час, за даними літератури, беручи до уваги особливості сегрегації хромосом під час мейозу, теоретично серед нащадків особи зі збалансованою реципрокною транслокацією можна очікувати близько 50 % саме таких: 25 % — збалансованих і фенотипічно нормальних і 25 % — нормальних генетично і фенотипічно [182], тобто, у 2,5 рази більше, ніж фактично ($p = 0,0003$).

Аналіз результатів сегрегації хромосом в мейозі носіїв транслокацій, для яких відомі результати щодо клінічних вагітностей та народження здорових дітей ($n = 291$), показав, що в родинках матерів-носіїв отримано 76,1 % ембріонів з незбалансованими транслокаціями і 23,9 %, придатних до ембріотрансферу, з яких 12,6 % мали збалансовані транслокації і 11,3 % були нормальні. У сім'ях батьків-носіїв транслокацій з 31 % ембріонів, придатних до переносу, 16,1 % визначені як такі, що мають незбалансовані транслокації і 14,9 % — нормальні. Середня кількість переносів ембріонів на цикл в цій роботі склала 1,6, а частота настання вагітності — 38 %. Для того, щоб уникнути перенесення ембріонів зі збалансованими транслокаціями, але анеуплоїдних, актуально проведення дослідження всіх хромосом ембріона, що може бути виконано методами NGS або aCGH для тестування анеуплоїдії 24 хромосом.

Таким чином, якщо загальна оцінка ризику народження нащадків з незбалансованими транслокаціями — 7 % для жінок і 3 % для чоловіків, носіїв транслокацій [182], то формування незбалансованих зигот в 10–20 разів більше — серед ембріонів на п'яту добу розвитку незбалансованість хромосомного набору становить 73,5 % і 81,3 %. Ймовірно, відбір на подальших етапах розвитку проти ембріонів та плодів з незбалансованими варіантами буде визначатися характером хромосомних аберацій з широким спектром реалізації — від ранньої загибелі ембріонів до спонтанних абортів на більш пізніх термінах гестації.

4.1.7 Оцінка показників відбору щодо носіїв транслокацій. Оскільки транслокації хромосом знижують репродукційну функцію їхніх носіїв, ми проаналізували власні дані для оцінки інтенсивності відбору щодо носіїв транслокацій.

Особи із транслокаціями, які звертаються за допомогою лікування безпліддя методами ДРТ, мають репродукційні втрати в анамнезі та не мають дітей (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

**Показники коефіцієнтів пристосованості та відбору
щодо носіїв транслокацій хромосом**

Характеристики носіїв транслокацій у програмах ДРТ							
Показник	N	N1	N2	N3, %	M	W	S
Значення	16	25	1–2	55,6	1,6	0,5	0,5

Примітки: N — кількість батьків-носіїв реципрокних транслокацій; N1 — кількість еуплоїдних ембріонів зі збалансованими транслокаціями; N2 — кількість ембріонів за один ембріотрансфер; N3 — ефективність ДРТ; M — показник плодючості здорових осіб; W — коефіцієнт пристосованості; S — коефіцієнт відбору.

До поля зору дослідників потрапляють ті особи, які, з одного боку, мають високий соціально-економічний рівень життя, з іншого — є носіями транслокацій, які суттєво знижують фертильність, тобто окремі категорії носіїв транслокацій з показником коефіцієнту відбору $S = 1$, $W = 0$. У такому випадку теоретично частота транслокацій може дорівнювати швидкості мутації [160]. Після усунення фенотипічних проявів домінантної мутації — лікування у програмах ДРТ, ПГТ-А/СП, відбувається зниження селективної невідповідності реципрокних транслокацій з $S = 1$ до $S = 0,5$. Таким чином, коефіцієнт відбору проти носіїв після застосування програм ДРТ знижується майже вдвічі (табл. 4.5). Але оскільки група досліджених зазвичай не є вибіркою усіх носіїв транслокацій серед населення, не є коректним зробити висновок про підвищення майже у двічі частоти реципрокних транслокацій у наступному поколінні.

Ми також проаналізували наукову інформацію австралійських дослідників [183], які представили первинні дані як результати масштабного генетичного-генеалогічного, цитогенетичного дослідження родин з носіями транслокацій. Автори роблять висновки, що показник репродукційних втрат в досліджених родинх склав приблизно 89,7 %. Згідно наведених авторами первинних даних, для носіїв транслокацій нами розраховані коефіцієнт пристосованості (W) — 0,2, та коефіцієнт відбору проти носіїв транслокацій (S) — 0,8, відповідно. Слід також зазначити, що отриманий показник відображає результати багаторазових спроб отримання успішної вагітності природним шляхом. Отримані результати можуть дати уявлення про загальні показники інтенсивності відбору проти транслокацій серед населення.

У той же час в літературі обговорюється питання про позитивний відбір за носійства окремих хромосомних мутацій. Наприклад, інверсії можуть показувати молекулярні ознаки позитивного відбору і бути пов'язані з більшою високою пристосованістю носіїв — інверсійні поліморфізми в 900 п. н. у локусі 17q21.31 демонструють позитивний відбір в ісландській популяції, та жінки-носії мають більшу кількість дітей і вищий рівень рекомбінації у

порівнянні з жінками з нормальним каріотипом [184, 185]. Описані родини, в яких обидва з подружжя, які були родичами, були гетерозиготами заінверсією та мали одного з дітей з гомозиготним генотипом [160].

Під час виконання досліджень ми не зустріли родин, в яких обоє батьків були носіями хромосомних або міжхромосомних перебудов, у тому числі транслокацій, хоча в літературі у 1995 році було представлено такий випадок. За даними американських авторів, подружжя із каріотипами 45, XX, t (13q14q) та 46, XY, t (1; 4) (q32; q25) мало трьох дітей: 45, XX, t (13; 14) t (1; 4); 45, XX, t (13q14q); 45, XX, t (13q14q) та три спонтанних аборти в анамнезі [186]. На думку фахівців, у таких родин існує підвищений ризик особливо несприятливого результату вагітності, але точна інформація щодо оцінок ризику для рідкісних випадків обмежена, що створює проблему під час консультування таких пацієнтів.

Таким чином, актуальним є привернути увагу до обговорення проблеми носійства генних і хромосомних мутацій родичами, які одружуються, в Україні, оскільки в останні десятиліття в країні спостерігається зміна генетико-демографічних параметрів в напрямку зростання показників інбридингу, особливо в сільській місцевості. Підвищення коефіцієнту інбридингу також може бути фактором ризику не тільки моногенної, але і хромосомної патології.

Очевидно, що оцінка популяційних показників носійства транслокацій не є досконалою, оскільки частина потенційних пацієнтів, носіїв збалансованих транслокацій, без фенотипічних і репродукційних відхилень, не потрапляє в поле зору фахівців. Сім'ї з сегрегуючими транслокаціями можуть бути враховані за пробандом або з приводу порушень фертильності. Розуміння поширеності сегментарних порушень каріотипу серед населення і сучасних методів дослідження дозволяє оптимізувати допомогу пацієнтам. Особливе значення виявлення сегрегуючих хромосомних перебудов має для подружжя, які перебувають у родинних стосунках. Теоретичною стороною

таких досліджень є накопичення даних для розуміння механізмів хромосомної еволюції.

4.2 Оптимізація скринінгу хромосомного набору ембріонів

Для встановлення хромосомних аномалій у ембріонів за ПГТ-А/СП визначення кількості копій хромосом зазвичай відбувається по всьому геному і не є цільовим. Основним завданням є виявлення якомога більше хромосом з високою роздільною здатністю, включаючи виявлення сегментарних відхилень [4].

Відомо, що на теперішній час лідируючі позиції серед методів аналізу переходять до підходів комплексного скринінгу хромосом, насамперед, шляхом мікроматричної порівняльної геномної гібридизації або секвенування наступного покоління, але завдяки потенціалу можливостей, на думку вчених, перевага в останні роки все більше віддається NGS [85, 86].

Оскільки вибір методології генетичного аналізу, важливість отримання низки параметрів і рівня результатів залежать від об'єкту та завдань дослідження, можливостей дослідників, економічної доцільності та мети і особливостей родини, ми представили свої підходи щодо оптимізації дослідження родин із носійством транслокацій у програмах ПГТ-А/СП.

4.2.1 Порівняння ефективності NGS і FISH технологій: комплексний скринінг 24 хромосом ембріонів. Методи сучасного комплексного скринінгу хромосом, KCX, (CCS, comprehensive chromosome screening) неоднакові за інформативністю результатів. Наприклад, KCX, заснований на NGS, дозволяє оптимізувати технологічну сторону визначення хромосомного набору ембріона [65], у той же час знижує ймовірність виявлення певних типів мозаїцизму, поліплодії, анеуплоїдії, не показує кількість хромосом в кожній клітині TE [187]. Рідина з бластоцеле (РБ) містить ДНК клітин TE і внутрішньої клітинної маси, які можуть мати різні типи анеуплоїдії [4].

Аналіз шляхом FISH дозволяє виявити справжній мозаїцизм і порушення плоїдності ембріона, що є надзвичайно важливим під час проведення передімплантаційного генетичного тесту на анеуплоїдію.

У разі дослідження транслокацій, коли точка розриву розташована настільки дистально, що її неможливо діагностувати іншими методами на основі ПЛР, які мають обмеження роздільної здатності, є необхідність застосування FISH [4]. Чим менше фрагмент хромосоми, залучений в транслокацію, тим ефективніше її детекція методом FISH [46]. У той же час, хромосоми, які не включені до панелі FISH, залишаються поза увагою дослідника [65, 67]. Таким чином, оптимізація скринінгу хромосомного набору ембріонів є актуальним питанням для підвищення його ефективності в програмах ДРТ.

Нами проаналізовані результати дослідження клітин ТЕ ембріонів на п'яту добу розвитку шляхом комплексного скринінгу 24 хромосом за технологією NGS-based CCS, верифіковані методом FISH. З 64,3 % зразків, які отримали однакові генетичні характеристики обома методами, 45,7 % ($n = 32$) були еуплоїдні, 18,6 % ($n = 13$) — анеуплоїдні [188, 189].

Ілюстрацію еуплоїдного набору хромосом зразка, виявленого за допомогою NGS, та підтвердженого результатами FISH, показано на рис. 4.1.

Ембріони з різними генетичними характеристиками ми представили декількома групами. Одна група об'єднувала ембріони з характеристиками, які формально можна визначити як «хромосомна патологія ембріона», яка встановлена обома методами — 14,3 %. З них у 7,1 % ембріонів в обох дослідженнях виявлена анеуплоїдія, але різних хромосом.

Розбіжність результатів відзначено в разі виявленої анеуплоїдії методом NGS і мозаїцизму з часткою до 50 % за плоїдністю $2n/4n$ методом FISH — 4,3 %.

У 2,9 % ембріонів методом NGS виявлено анеуплоїдію або мозаїцизм, тоді як методом FISH було встановлено поєднання анеуплоїдії і мозаїцизму [188, 189].

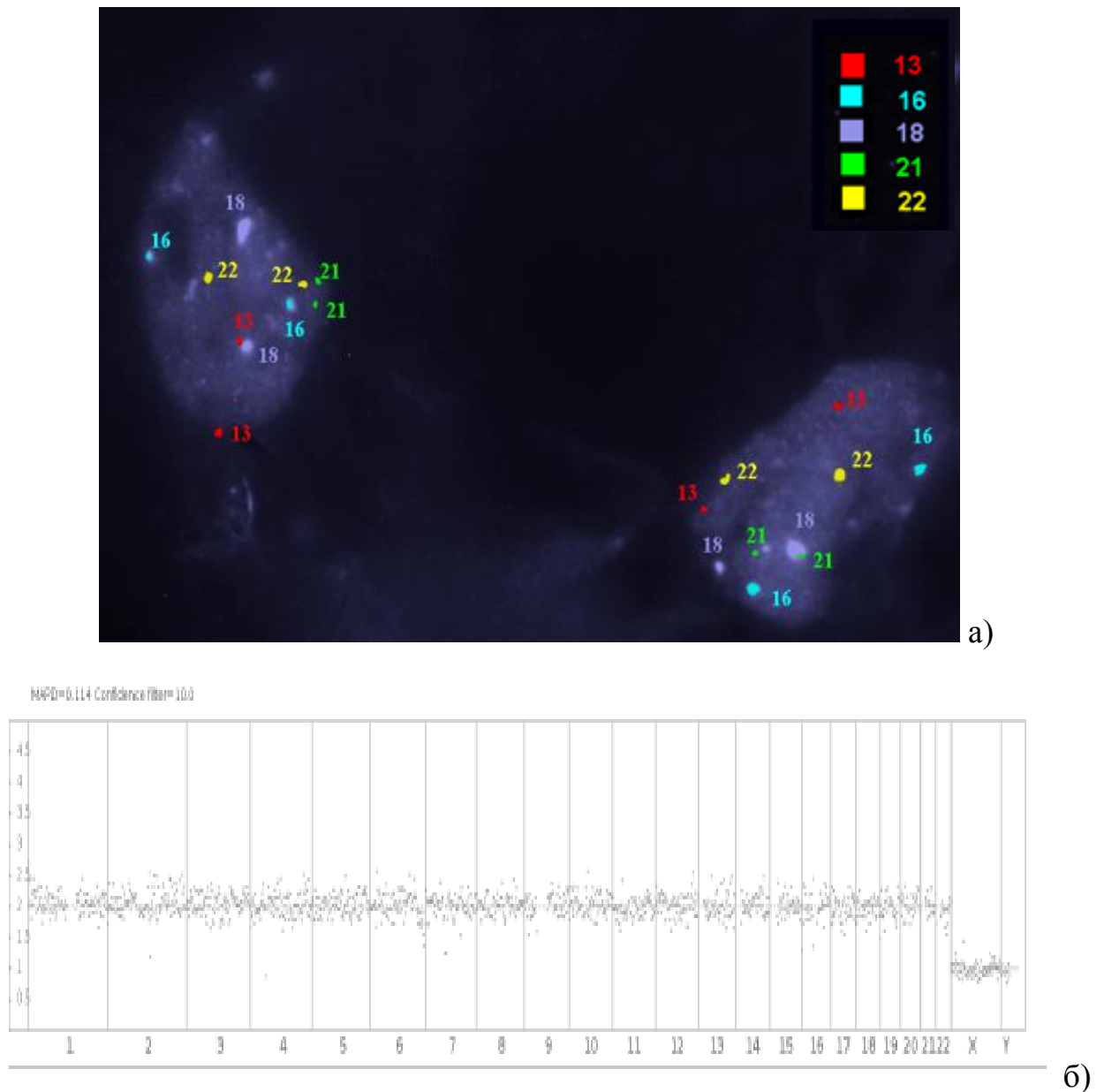


Рис. 4.1. **а)** Зображення інтерфазних ядер клітин ТЕ з флуоресцентними мітками хромосом 13, 16, 18, 21, 22, відповідає еуплоїдному набору хромосом, набір «MultiVysion PB» («Abbott-Vysis», USA), збільшення 10×100 (ориг.); **б)** Результати секвенування зразка того ж ембріона, еуплоїдний набір хромосом.

На рис. 4.2 наведено приклад результату дослідження зразка, в якому було виявлено мозаїцизм за плоїдністю набору хромосом в ядрах клітин ТЕ методом флуоресцентної гібридизації *in situ* (рис. 4.2). Методом секвенування було встановлено, що результат дослідження не відрізняється від кривої зразка з нормальним хромосомним набором (рис. 4.2, б).

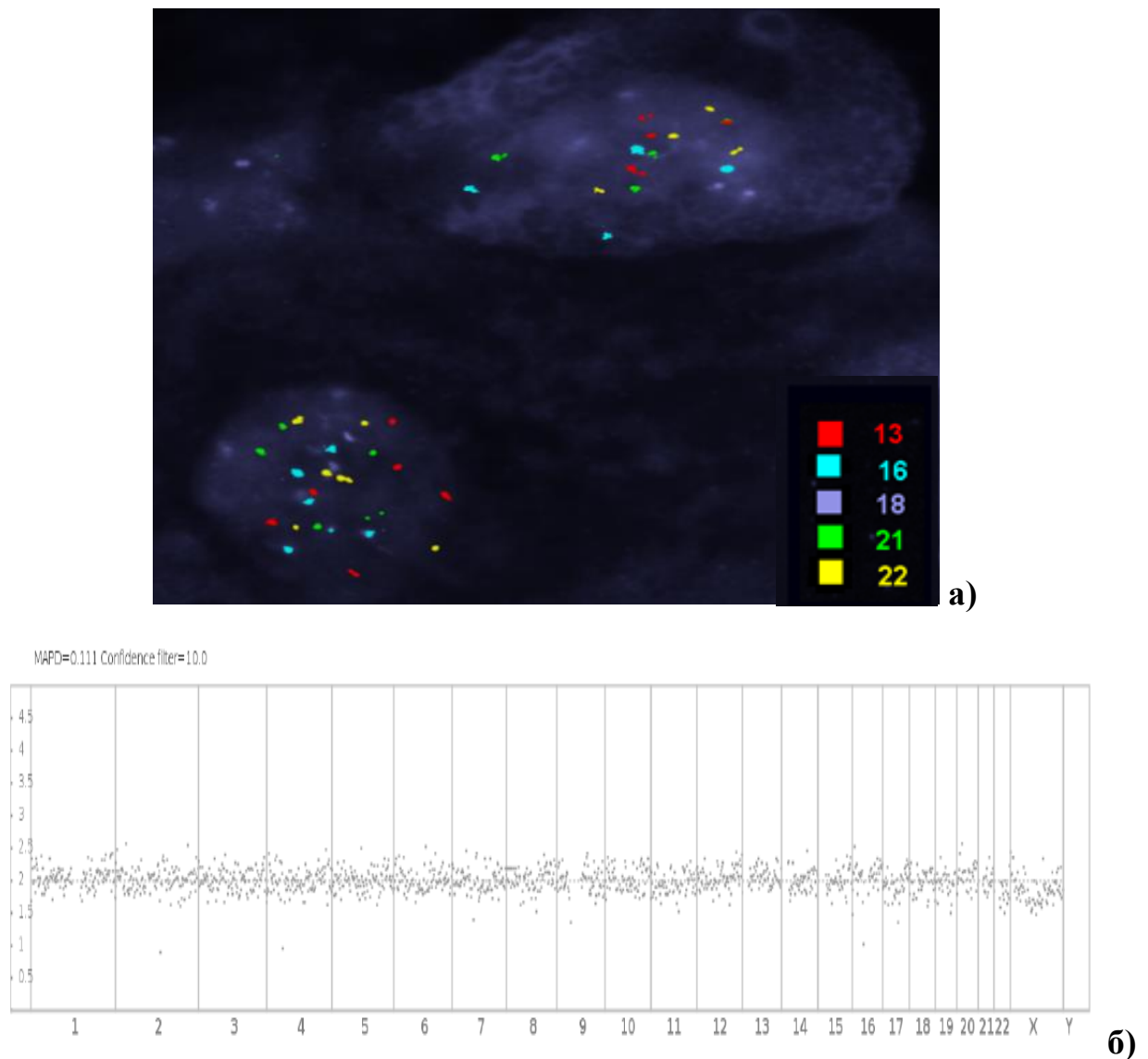


Рис. 4.2. **а)** Зображення інтерфазних ядер клітин ТЕ з флуоресцентними мітками хромосом 13, 16, 18, 21, 22, відповідає поліплоїдному набору хромосом ($4n$ і $6n$), набір «MultiVysion PB» («Abbott-Vysis», USA), збільшення 10×100 (ориг.); **б)** Результати секвенування нового покоління зразка того ж ембріона, показаний еуплоїдний набір хромосом.

До наступної групи можна віднести випадки, за яких лише один з методів показав хромосомну аномалію ембріона — у $10,0\%$ зразків анеуплоїдію, причому в $8,6\%$ аномальна кількість хромосом була виявлена за допомогою методу NGS; $4,3\%$ ембріона були еуплоїдні за результатом NGS і мозаїчні за плоїдністю $2n/4n$, згідно FISH; $5,7\%$ зразків нормальні, згідно NGS, і мозаїчні за анеуплоїдією/анеуплоїдних, згідно FISH і $1,4\%$ — навпаки.

Наприклад, секвенування ДНК ембріона, що мав моносомії за хромосомами 18 і 22, які виявлені під час аналізу методом FISH (рис. 4.3, а), виявило моносомію за хромосомою 18, але, в той же час, моносомія за хромосомою 22 була ідентифікована як норма — показники розподілу кількості ДНК перебували в межах «сірої зони» (рис. 4.3, б) [188–190].

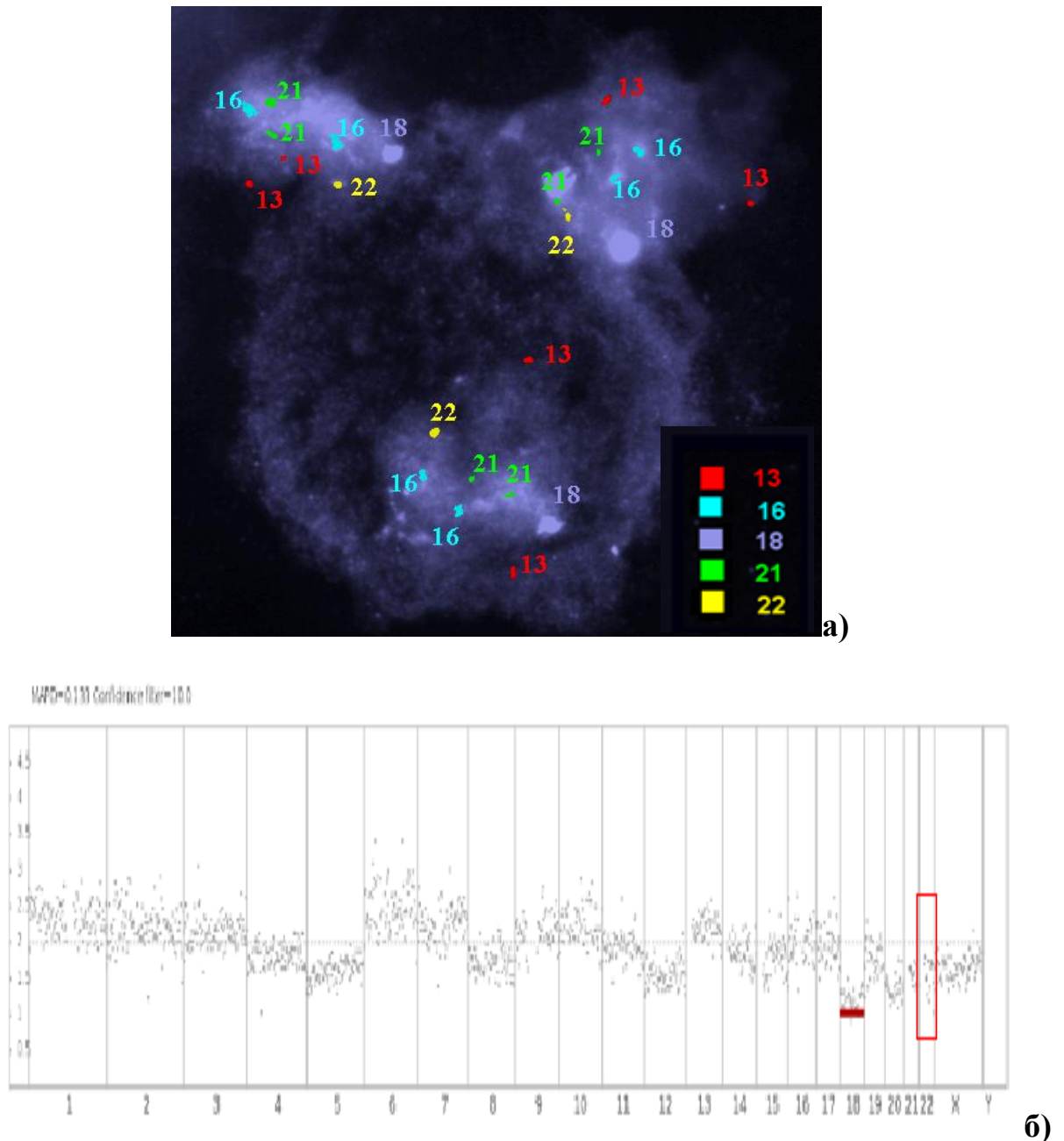


Рис. 4.3. а) Зображення інтерфазних ядер клітин ТЕ з флуоресцентними мітками хромосом 13, 16, 18, 21, 22, відповідає анеупloidії хромосом 18 і 22, набір «MultiVysion PB» («Abbott-Vysis», USA), збільшення 10×100 (ориг.); б) Результати секвенування того ж зразка, показано моносомію 18, але не відображено моносомію 22.

12,8 % ембріонів, проаналізованих за зразками рідини бластоцелі (РБ) і 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 за дослідження FISH і в РБ методом NGS (табл. 4.6).

Таблиця 4.6

**Генетичні характеристики ембріонів,
отримані методами FISH та NGS**

Параметри результату			Результат дослідження NGS/FISH	N	%	Разом	
						<i>n</i>	%
Одна-ковий результат	Справжній	Норма	N/N	32	45,7	45	64,3
		Анеуплоїдія	An/An	13	18,6		
	Формальний – хромосомна патологія ембріона	Анеуплоїдія різних хромосом	An/An	5	7,1	10	14,3
		Різні порушення та їх поєднання	An/mos	3	4,3		
			An або mos/An+m os	2	2,9		
Разом						55	78,6
Різний результат		Хромосомну аномалію визначено одним з двох методів	An/N	6	8,6	7	10,0
			N/An	1	1,4		
			N/mos	3	4,3	8	11,4
			N/mos або An	4	5,7		
			mos або An/N	1	1,4		
Разом						15	21,4

Примітки: N — кількість; An — анеуплоїдія; mos — мозаїцизм; *n* — кількість.

Зіставний результат за застосування двох методів — виявлення хромосомних аномалій або нормальний хромосомний набір, отримані нами для 78,6 % ембріонів, що характеризує результативність дослідження методом NGS.

У той же час, за даними ряду авторів, розбіжність результатів у разі аналізу каріотипу ембріонів, наприклад, методами а-CGH і FISH склала 1,9 % [6]. Проведення мікроматричної порівняльної геномної гібридизації для окремих клітин ембріонів, раніше діагностованих як аномальні, методом FISH, продемонструвало високі показники співставності [190]. Однак ці ж автори вважають, що не слід розглядати метод FISH як достатній для валідації і підтвердження результатів КСХ [6, 190].

Відомо, що мозаїцизм є важливою характеристикою, яку, за даними різних авторів [191], слід враховувати і досліджувати за послідовного аналізу декількох зразків одного і того ж ембріона. У зв'язку з цим, одним із способів виявлення істинного мозаїцизму за комплексного скринінгу хромосом може стати оцінка ембріона, для якого вже були проведені дві послідовні діагностики після двох окремих біопсій з використанням альтернативних методологій дослідження хромосом [192, 193].

Дослідження каріотипу ембріонів шляхом FISH ($n = 287$) та NGS ($n = 365$) визначило розподіл показників норми, анеуплоїдії, мозаїцизму та поліплоїдії у відношенні 35,6 %:28,9 %:28,2 %:7,3 % та 38,9 %:51,8 %:1,6 %:0 % ($p < 0,001$), відповідно (табл. 4.7).

Майже вдвічі більше анеуплоїдій визначено методом NGS, 51,8 % у порівнянні з 28,9 % ($p < 0,001$) (табл. 4.7), що може бути обумовлено особливостями методу секвенування нового покоління щодо детекції статусу усіх хромосом, на відміну від FISH, можливості якого обмежені хромосомами панелі дослідження. У той же час більш результативним щодо тестування справжнього мозаїцизму та поліплоїдії є FISH (табл. 4.7). Зіставний показник отримано щодо еуплоїдних ембріонів.

**Результати аналізу спектру хромосомних особливостей ембріонів,
визначених методами FISH та NGS**

Хромосомний статус ембріона	Результати тестування ембріонів			
	Метод FISH		Метод NGS	
	N	%	N	%
Еуплоїдія	102	35,6	142	38,9
Анеуплоїдія	83	28,9*	189	51,8*
Мозаїк	81	28,2	6	1,6
Поліплоїдія	21	7,3	0	0
Дуплікації	0	0	16	4,4
Делеції	0	0	9	2,5
Делеції та дуплікації	0	0	3	0,8
Разом	287	100	365	100

Примітки: * — $p < 0,001$

Але з даних літератури відомо, що визначення цих порушень шляхом NGS є більш ефективним в порівнянні з результатами aCGH. Розбіжності у визначенні мозаїчності ембріонів, які були діагностовані як euploidні за допомогою aCGH, склали 6,7 %-31,6 % після аналізу NGS високої роздільної здатності. 5,2 % ембріонів виявилися поліплоїдними за результатами NGS після аналізу aCGH. Автори припустили, що застосування різних методів сприятиме поліпшенню виявлення порушень та надасть позитивний вплив на клінічні наслідки за рахунок зниження частоти викиднів [194, 195]

Важливо відзначити, що про мозаїцизм зазвичай повідомляють, коли він ідентифікується методом NGS, наприклад, за біопсії TE з 5–10 клітин ембріона, що містить, від 60 до 150 клітин. За даними [65], рівень мозаїцизму

нижче 20 % в дослідженому зразку залишався нижче межі виявлення за використовуваної методики, а ембріон класифікувався як еуплоїдний, на рівні 20–40 % відзначався низькорівневий мозаїцизм, за 40–80 % — високий рівень мозаїцизму і за більш 80 % — анеуплоїдних. Інші автори відзначають, що ембріони з показниками мозаїцизму близько 20–50 % потрапляють в одну категорію «з більш низьким ризиком», а ембріони з рівнем вище 50 % можна вважати анеуплоїдними з «високим ризиком» і не планувати їх для перенесення [195]. За пропозицією PGDIS, показник мозаїцизму $> 20\%$ в можна використовувати як межу для встановлення мозаїцизму при використанні методу NGS, нижчі рівні мозаїцизму ($< 20\%$) розглядати як норму, а ембріони з показниками 20–80 % відносити до еуплоїдно-анеуплоїдних мозаїків.

Таким чином, шляхом NGS було виявлено надлишки або нестачі генетичного матеріалу, що доцільно врахувати під час визначення незбалансованих транслокацій. Також, доцільним є поєднання методів дослідження ембріонів шляхом ПГТ-А/СП, особливо за їхньої обмеженої кількості та якості та за необхідності відбору ембріона для додаткового виключення розвитку генної патології шляхом ПГТ-М.

4.2.2 Приклади визначення транслокацій за ПГТ-А/СП. Транслокації привертають особливу увагу дослідників, в першу чергу, через необхідність визначення генетичного ризику та алгоритму допомоги родині носіїв [6, 10, 11], який доцільно створити в умовах кожного медичного центру. Для пацієнтів-носіїв існує необхідність в доклінічному обстеженні, щоб підтвердити хромосомні перебудови та оцінити специфічність сигналу. Це служить для виключення будь-яких перехресних гібридизацій завдяки дослідженню що найменше 10 метафазних і 100 інтерфазних клітин периферичної крові [4].

За нашими даними, як і за даними літератури, найбільш показовими для виявлення цього типу хромосомних перебудов у клітинах зразків периферичної крові, ворсин хоріона, в амніоцитах є методи диференційного

забарвлення хромосом, наприклад, GTG (Giemsa stain), CBG (Constitutive heterochromatine), NOR (Nuclear Organization Regions) [165], які допомагають візуалізувати структурні особливості кожної хромосоми. У теперішній час тільки використання класичних цитогенетичних методів і фарбування препаратів методом GTG, а також уточнюючих методів CBG та NOR, дає можливість виявити структурні аберації хромосом із встановленням локалізації перебудови, зокрема і транслокації [196]. Найсучасніші методи здатні виявити точну локалізацію делеції або дуплікації на конкретній хромосомі тільки у варіантах незбалансованих транслокацій, але не здатні вказати, між якими хромосомами пройшов обмін, тому у детекції збалансованих транслокацій такі методи безсилі [197].

У той же час методи диференційного забарвлення хромосом непридатні щодо ембріонів за ПГТ, оскільки більшість клітин знаходяться в інтерфазі із деспіралізованою ДНК [162]. FISH для детекції транслокацій ефективна у разі тестування бластомерів ембріонів на стадії дроблення [182] і TE на стадії бластоцисти, але під час дослідження полярних тіл виникають технічні труднощі внаслідок складнощів фіксації і хромосомних накладень. Крім того, за FISH зазвичай не досліджуються всі хромосоми, що залишає вірогідність не виявити анеуплоїдію хромосом, не пов'язану з транслокацією, і які не ввійшли в стандартну панель дослідження. Використання NGS для скринінгу анеуплоїдій всіх хромосом досліджуваних біологічних зразків дозволяє побачити зміни кількості генетичного матеріалу за наявності хромосомних аберацій. Але, за даними літератури, найменші фрагменти, виявлені за NGS, становили до 5 МБ, а фрагменти 2,8 МБ, раніше виявлені авторами за CGH в тих самих зразках, були пропущені за NGS [198].

В якості ілюстрації наших підходів щодо детекції транслокацій за ПГТ-А/СП ми наводимо приклади родин, в якій жінка є носієм реципрокної транслокації.

Приклад 1. Для визначення материнської трас локації застосовано GTG-метод та встановлено каріотип — 46, XX, t (7;9)(q11.23;q21.2), а

отримані ембріони були досліджені за допомогою NGS, оскільки юридичних та релігійних обмежень щодо дослідження ембріонів не було, а вік подружжя припускав необхідність виключення анеуплоїдії всіх хромосом.

На рис. 4.4 представлений аномальний набір хромосом ембріона 1 з виявленими делецією хромосоми 7 між смугами 7p22.3 і 7q21.1 і дуплікацією хромосоми 9 між смугами 9p24.3 і 9q22.2 [166].

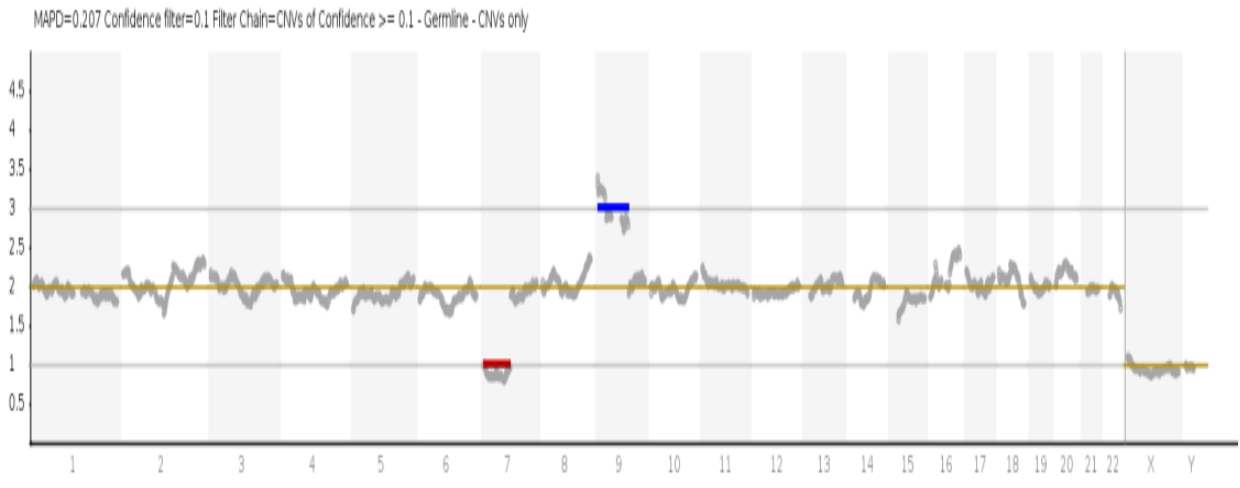


Рис. 4.4. Результати секвенування нового покоління зразка ембріона 1,46,XY,del(7)(p22.3q21.11),dup(9)(p24.3q22.2).

На рис. 4.5 представлено аномальний набір хромосом з виявленими моносомією 7 і трисомією 9.

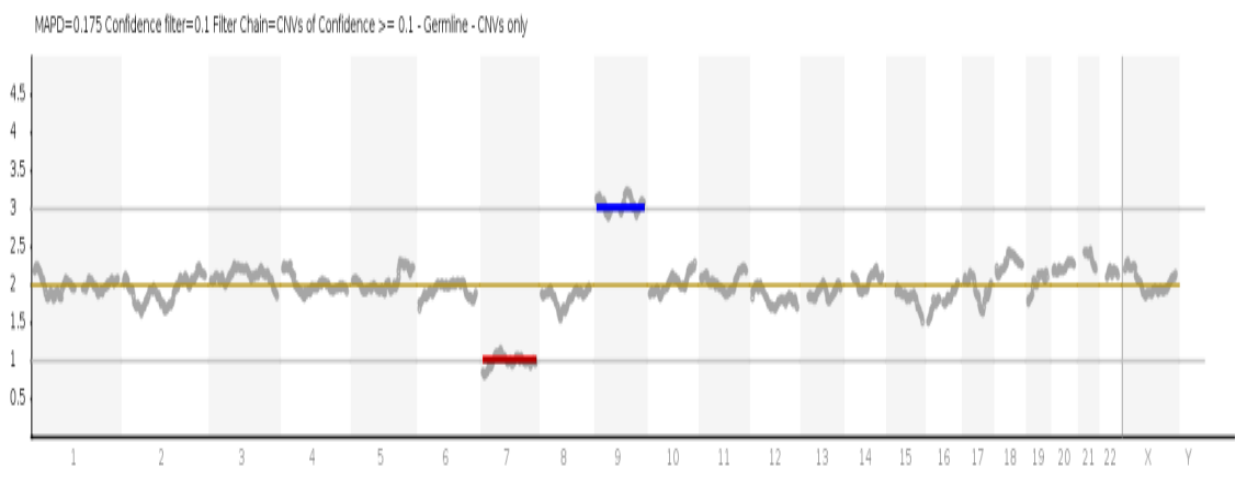


Рис. 4.5. Результати секвенування нового покоління зразка ембріона 2,46,XX,-7,+9.

Приклад 2. Іншим прикладом є виявлення материнської транслокації — 46,XX,t(2;22)(q21; q11.2) (рис. 4.6) з подальшим дослідженням ембріона методом FISH в кілька раундів для верифікації сегрегуючої транслокації (рис. 4.7, 4.8, 4.9), оскільки юридичних та релігійних обмежень щодо 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 [46, 7], якщо залучені хромосоми включені до панелі дослідження.

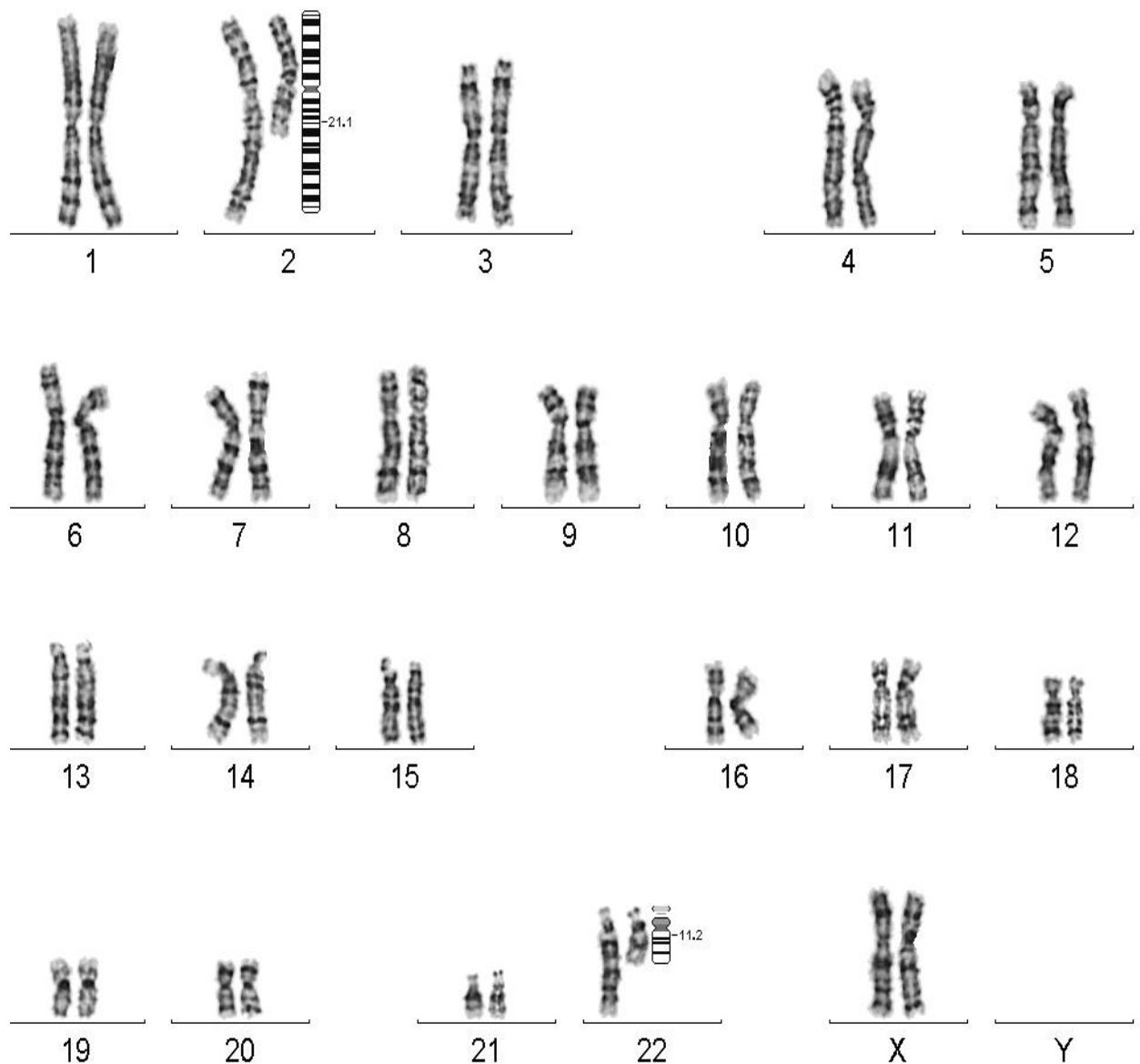


Рис. 4.6. Каріотип матері, 46,XX,t(2;22)(q21;q11.2).

Сигнали на рис. 4.7 вказують на збалансованість ділянок хромосоми 2, залучених у транслокацію, у ембріона.

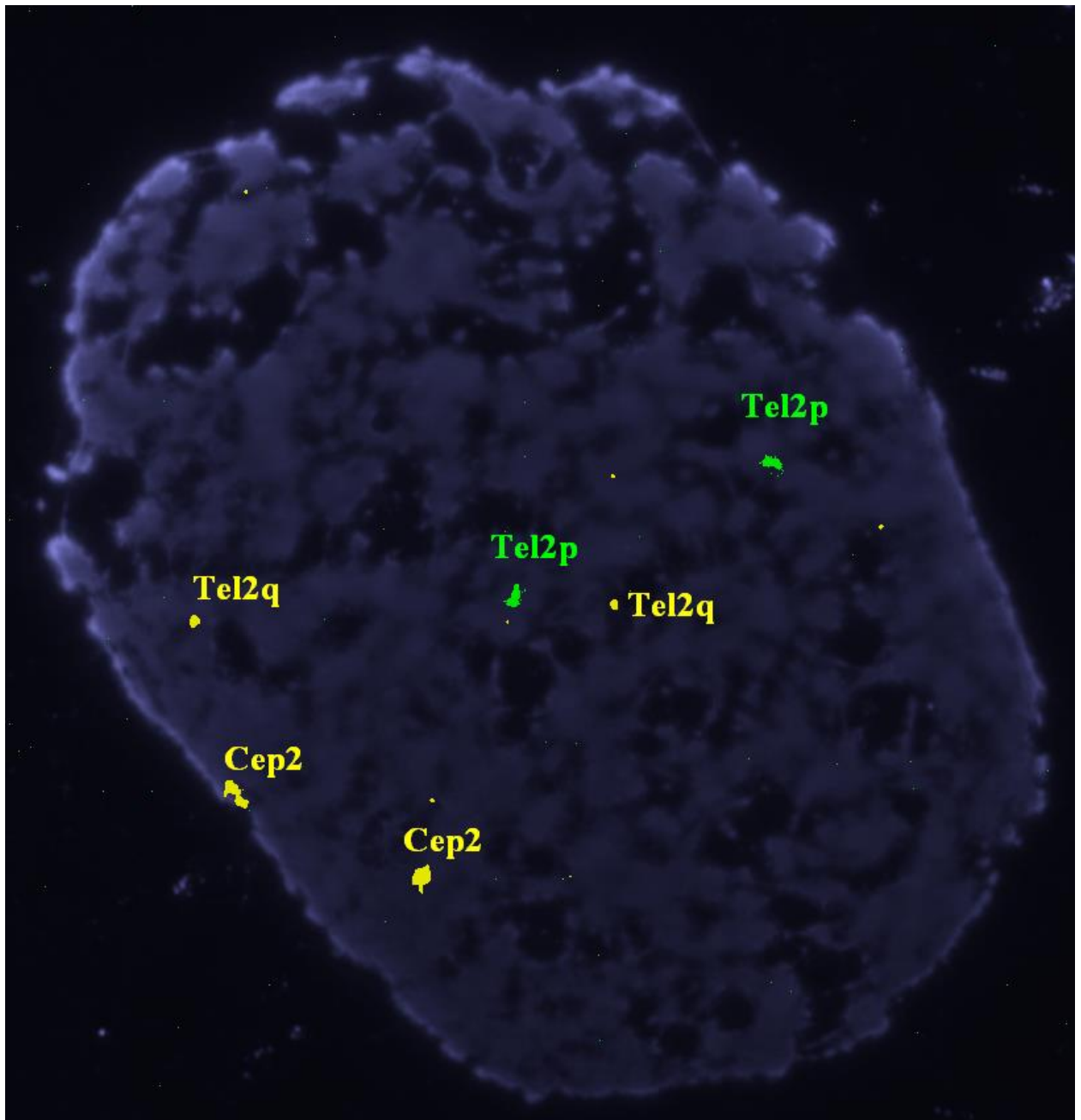


Рис. 4.7. Бластомер ембріона, раунд 1, зонди для варіанту хромосоми 2: CEP 2, Tel 2p, Tel2q.

Сигнали на рис. 4.8 вказують на збалансованість ділянок хромосом 2 і 22, залучених в транслокацію, у ембріона.

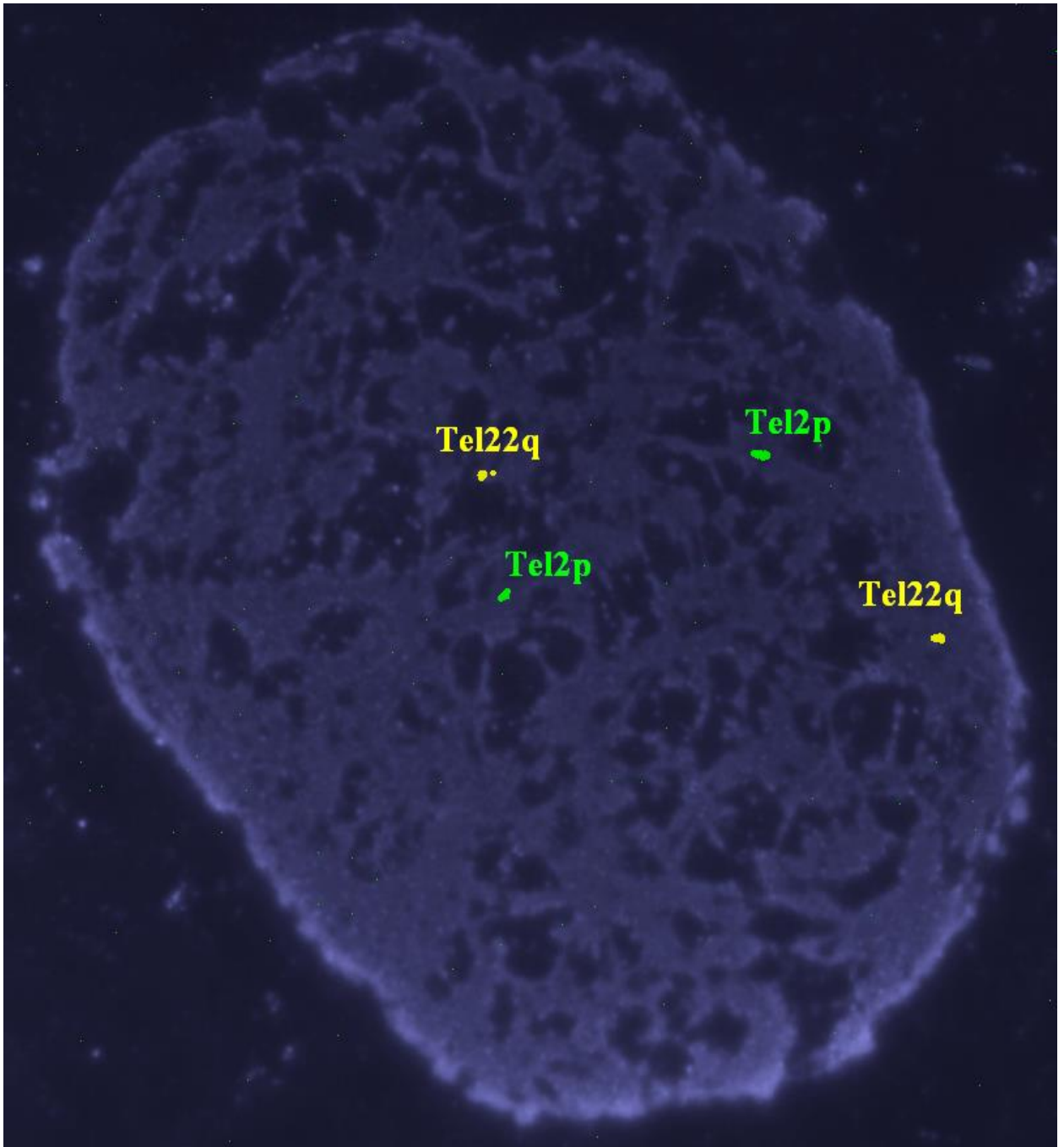


Рис. 4.8. Бластомер ембріона, раунд 2, зонди для хромосом 2 та 22: Tel 2p, Tel22q.

Сигнали досліджуваних хромосом на рис. 4.9 вказують на їх нормальну кількість, стать ембріона — жіноча.

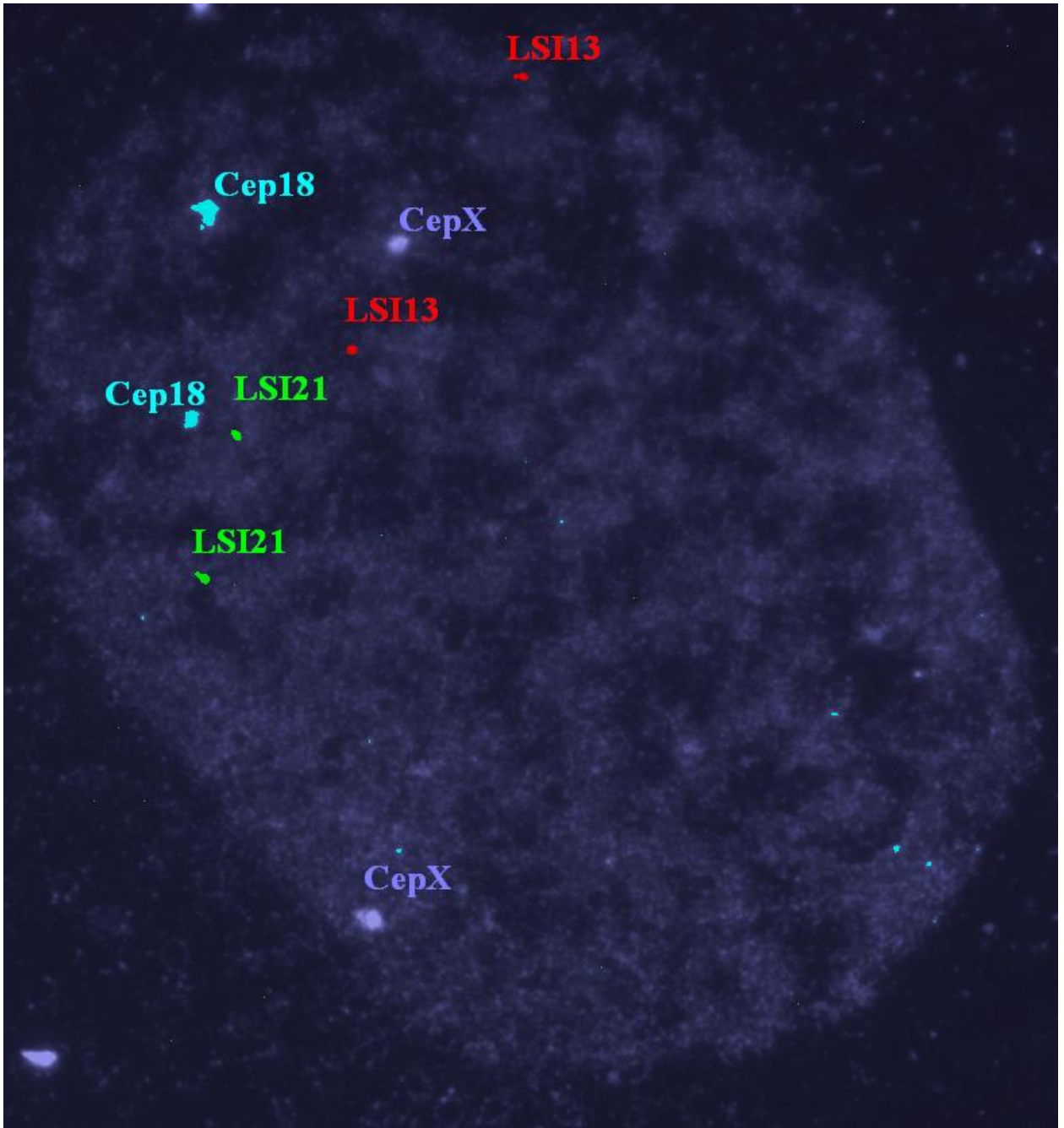


Рис. 4.9. Бластомер ембріона, раунд 3, зонди для виявлення найбільш частих анеуплоїдій 13, 18, 21,X,Y: LSI 13q34, CEP 18, LSI 21q21.2, CEPX, CEPY.

Таким чином, після комплексного обстеження та проведення генеалогічного аналізу для подальшого генетичного аналізу родини доцільно застосовувати методи, які будуть ефективні для виявлення досліджуваної хромосомної аномалії. Для родин, носіїв реципрокних транслокацій, для детекції останніх, у батьків доцільне застосування методів диференційного

забарвлення хромосом, наприклад, GTG-методу, у разі подальшого ПГТ-СП для верифікації сегрегуючої транслокації — технології, які мають високу роздільну здатність, високопродуктивне секвенування — NGS або FISH в кілька раундів, якщо залучені хромосоми включені до панелі дослідження.

Крім того, на нашу думку, за селекції ембріонів доцільним є проведення комплексного дослідження генетичних параметрів з використанням кількох не тільки методів, але і видів біологічних зразків, з урахуванням біологічних та соціальних особливостей родини, для вибору ембріона. Щодо теоретичного значення отриманих результатів, то вони дозволяють розширити уявлення про формування генетичних характеристик ранніх етапів ембріонального розвитку людини.

Публікації за темою розділу дисертації:

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: 10.7124/feeo.v27.1325. (Дисертант брав участь у розробці методології дослідження, інтерпретації результатів, підготовці статті до публікації).

2. **Верлінський О. Ю.**, Гонтар Ю. В., Казачкова Н. И., Лахно Я. В., Ільїн І. Є., Федота О. М. Дослідження робертсонівських та реципрокних транслокацій людини у програмах допоміжних репродукційних технологій. *Актуальні питання сучасної медицини : тези доп. XVII міжнар. наук. конф. студ., мол. вчених та фахівців, присвяч. 215-річчю заснування мед. ф-ту Харків. нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна, Харків, 26–27 бер. 2020 р.* Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2020. С. 59.

3. 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: 10.7124/feeo.v21.858. (Дисертант брав участь у

розробці методології дослідження, інтерпретації результатів, підготовці статті до публікації).

4. **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 доп. XVII міжнар. наук. конф. студ., мол. вчених та фахівців, присвяч. 215-річчю заснування мед. ф-ту Харків. нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна, Харків, 26–27 бер. 2020 р.* Харків: ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2020. С. 58.

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: 10.7124/visnyk.utgis.14.1.539. *(Дисертант брав участь у розробці методології дослідження, інтерпретації результатів, підготовці статті до публікації).*

6. Kuliev A., Rechitsky S., **Verlinsky O.** Atlas of preimplantation genetic diagnosis. 3rd ed. London: CRC Press, 2014. 328 pp. DOI: 10.1201/b16719. *(Дисертант брав участь у розробці методологій досліджень, проведенні досліджень, інтерпретації результатів, підготовці монографії до друку).*

РОЗДІЛ 5

МОНОГЕННІ ПАТОЛОГІЇ І ПРЕІМПЛАНТАЦІЙНЕ ГЕНЕТИЧНЕ ТЕСТУВАННЯ

5.1 Преімплантаційне генетичне тестування моногенних захворювань

Імовірність народження дитини з моногенною патологією у теперішній час залежить від низки факторів, у тому числі від ступеня споріднення батьків і їхнього походження, від типу успадкування, популяційної частоти мутацій, від можливості появи мутацій *de novo*, від гонадного мозаїцизму батьків та інших причин [4, 8, 199]. Підвищення рівня медичної допомоги населенню, розвиток програм неонатального скринінгу і підходів щодо лікування генетичних захворювань створює передумови до зниження тиску відбору проти патологічних генотипів, сприяє збільшенню генетичного тягаря в людських популяціях [201] і, як наслідок, необхідності звернення до генетичних технологій, в тому числі до ПГТ моногенних патологій для отримання здорових нащадків [31, 200, 201]. Технологічні рішення у галузі генетики репродукції потребують вдосконалення підходів до ПГТ-М для ефективної допомоги сім'ям з урахуванням їхніх особливостей.

5.1.1 Визначення характеристик родин з моногенними патологіями, які звертаються до ПГТ-М. Дослідження родин з моногенними захворюваннями, які звертаються до ДРТ — до ПГТ-М, показало, що їх перелік становить більше 200 і виходить за межі традиційних показань до пренатальної діагностики. Аутосомно-домінантні патології склали 39,4 % ($n = 89$), аутосомно-рецесивні — 43,8 % ($n = 99$) і Х-зчеплені — 16,8 % ($n = 38$) в загальній структурі зазначеної генетичної патології. Частка пацієнтів з аутосомно-домінантними захворюваннями склала 29,1 % ($n = 472$), з аутосомно-рецесивними — 49,5 % ($n = 803$), з Х-зчепленими — 21,4 % ($n = 346$) серед всіх обстежених осіб [202–204]. Найчастіше показаннями до ПГТ-М був муковісцидоз, гемоглобінпатія, міотонічна дистрофія, синдром ламкої Х-хромосоми (табл. 5.1), що узгоджується з даними інших авторів [35, 42–45].

**Приклади результатів ПТГ-М для сімей із моногенними патологіями,
які найчастіше звертаються до ДРТ**

Патологія	Ген	Тип успадкування	Кількість, <i>n</i>				
			Пацієнтів	Ембріонів до трансферу	Трансферів	Вагітностей	Народжень
Муковісцидоз	<i>CFTR</i>	АР	278	703	359	182	192
Гемоглобінпатія, альфа локус 1	<i>HBB</i>	АР	209	607	289	112	116
Синдром ламкої Х-хромосоми	<i>FMR1</i>	ХС	151	370	218	102	94
Міотонічна дистрофія 1	<i>DMPK</i>	АД	65	144	91	29	24
Бета-таласемія (Гемоглобінпатія, бета локус 1)	<i>HBB</i>	АР	61	121	78	20	15
Спінальна м'язова атрофія 1	<i>SMN1</i>	АР	47	91	51	33	41
Гемофілія А	<i>F8</i>	ХС	36	99	51	28	26
Нейрофіброматоз 1	<i>NF1</i>	АД	32	88	52	22	22
М'язова дистрофія Дюшенна-Беккера	<i>DMD</i>	ХС	33	96	49	28	24

Хворим або носієм мутації були представники обох статей. Підставою для звернення до ДРТ для проведення ПГТ-М для народження здорових дітей була наявність хворих нащадків в сім'ї або інших хворих родичів близьких ступенів спорідненості.

Після проведення ПГТ-М та трансферу 4 419 нормальних ембріонів в 2 396 (80,3 %) циклах (1,84 ембріона в середньому на трансфер) та розвитку 1 905 (45,7 %) здорових вагітностей спостерігалось народження 1 118 здорових дітей без моногенної патології і 47 здорових вагітностей, які тривали на момент обліку даних [203–205].

Аналіз отриманих даних дозволив визначити зворотний зв'язок між кількістю ембріонів на перенесення пацієнтові і народжених здорових дітей, що припадають на пацієнта ($r = -0,49$, $p = 0,022$), незалежно від типу успадкування патології в родині, що свідчить на користь практики перенесення одного ембріона.

Аналіз також показав, що показник народження здорових дітей на одного пацієнта становить 0,3–0,9 і він зіставний для різних захворювань ($p = 0,999$). Приклади результатів ПГТ-М для сімей із моногенними патологіями, що найчастіше звертаються до ДРТ, представлені в табл. 5.1.

Таким чином, доцільним є проаналізувати застосовані підходи до ПГТ-М з урахуванням отриманих результатів для визначення найбільш актуальних позицій для врахування та оптимізації досліджень.

5.1.2 Вік батьків із родин з груп ризику щодо моногенних патологій та комбіноване ПГТ-М та ПГТ-А. Особливістю родин, які планують ПГТ-М, може бути пізній репродукційний вік пари, > 36 років, що є вагомим аргументом проведення тестування 24 хромосом на анеуплоїдії. Наявність зайвої або присутність єдиної хромосоми з пари, що включає мутацію, створює додаткові ризики народження хворої дитини.

Проведення ПГТ моногенних патологій одночасно із ефективним виявленням ооцитів і ембріонів з хромосомними аномаліями можливо завдяки методам повногеномної ампліфікації. Технологічно платформи для

таких досліджень дозволяють проводити тестування всіх матеріалів біопсії, включаючи перше і друге полярні тільця, бластомери і бластоцисти, виконати тест протягом 12 год після біопсії і забезпечити точні результати більш ніж в 90 % зразків [213].

В осіб з 83 родин з з ризиком народження дітей з різними моногенними патологіями було проведено ПГТ-М одночасно з ПГТ-А. Було досліджено 1 054 ембріони, в тому числі 320 — за допомогою біопсії бластоцисти, 670 — за допомогою біопсії бластомера і 64 — шляхом комбінованої біопсії полярного тільця і біопсії бластоцисти. П'ять з циклів виконувались із супутнім HLA-типуванням, в тому числі для хронічної гранульоматозної хвороби, таласемії, анемії Даймонда-Блекфана.

Аналіз результатів дослідження щодо визначення показників анеуплоїдії під час ПГТ-М продемонстрував, що анеуплоїдія була виключена у 41,2 % ($n = 434$) протестованих ембріонів. Ембріони, придатні дотрансферу, 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. Частина ембріонів була заморожена, і 51 ембріон був перенесений пізніше, що призвело до 40 (78,4 %) клінічних вагітностей і народження 45 здорових дітей.

Таким чином, тестування для виключення анеуплоїдії і мутацій, які зумовлюють моногенну патологію, дали можливість перенесення 92 ембріонів, 61 (66,3 %) клінічну вагітність і народження 69 здорових дітей, що є підвищенням репродукційних показників у осіб з родин з груп ризику щодо моногенних патологій у критичному репродукційному віці [203–205].

5.1.3 Термін розвитку ембріонів та комбіноване ПГТ-М та ПГТ-А.

Аналіз результатів щодо одночасного проведення ПГТ-М і ПГТ-А з використанням різних біологічних зразків (табл. 5.2) показав, що під час дослідження клітин ТЕ 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) ($p < 0,05$).

Таблиця 5.2

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

Тип клітин	Кількість, n(%)						
	Пацієнтів	Циклів	Ембріонів тестованих	Ембріонів, придатних до трансферу	Ембріонів до трансферу	Вагітностей	Народжень
ТЕ	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
Разом	83	138	1054	434	139	61	57

Примітки: Б — бластомер; ПТ — полярне тільце.

У той же час співвідношення кількості перенесених ембріонів, отриманих здорових вагітностей і народжених дітей до одного пацієнта під час виконання досліджень за всіх трьох підходів зіставні і не мають статистично значущої різниці ($p > 0,05$). Співвідношення пацієнтів з домінантними і рецесивними патологіями в сім'ях в перших двох групах також є зіставним (табл. 5.2).

Таким чином, за ПГТ-М і ПГТ-А дослідження ембріонів на п'яту добу є більш доцільним, оскільки дозволяє отримати співставні результати на третю добу показники народження здорових дітей, але за менших часових, економічних і репродукційних навантажень.

5.1.4 HLA-типівання як фактор тестування анеупloidії одночасно з ПГТ-М. Аналіз власних даних щодо проведених ПГТ-М показав, що важливою групою сімей, які вимагають окремої уваги генетиків і оптимізації

ПГТ, є сім'ї з хворими на моногенні патології, які потребують алогенної трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин. Для таких родин доцільним є HLA-типування ембріонів.

Аналіз показав, що за ПГТ-М з проведенням HLA-типування у 6,0 % ембріонів встановлено анеуплоїдію хромосоми 6, яка впливає на кінцевий результат HLA-типування. Оскільки присутність зайвої або єдиної хромосоми з відповідної пари створює додаткові ризики отримання хибного результату, тому для родин, які потребують ПГТ-М з урахуванням HLA-типування, доцільним є супутнє тестування на анеуплоїдію. Додатковим аргументом на користь останнього може бути підвищений репродукційний вік потенційних батьків ембріонів, > 36 років.

Результати HLA-типування за ПГТ-М, проведеного в сім'ях з 23 різними моногенними патологіями, найчастіше з гемоглобінпатіями, таласемією і серповидно-клітинною анемією, представлено у табл. 5.3. 351 HLA-тіпований здоровий ембріон було перенесено в 230 циклах (табл. 5.3), та від 72 здорових вагітностей народилося 59 HLA-ідентичних сибсам дітей, потенційних донорів для сибсів.

Аналіз отриманих результатів показав, що після ПГТ-М з проведенням HLA-типування, частота настання вагітності у 151 пари без тестування на анеуплоїдію склала 23,0 %. У той же час таке ж дослідження з тестуванням анеуплоїдії, виконане для 91 сімейної пари, дозволило отримати здорову вагітність в 40,0 % випадків ($p < 0,01$).

У якості прикладу нижче представлені наші результати ПГТ-М з HLA-типуванням ембріонів в родин із синдромом Швахмана–Даймонда. Відомо, що синдром Швахмана–Даймонда (СДС) — аутосомно-рецесивна патологія, яка характеризується екзокринною недостатністю підшлункової залози, прогресуючою недостатністю кісткового мозку, гематологічними порушеннями і схильністю до мієлодисплазії і лейкемії. Основні клінічні симптоми захворювання діагностуються протягом перших шести місяців життя [205].

Таблиця 5.3

**Приклади результатів ПГТ-М і HLA-типування
для сімей з моногенними патологіями**

Групи патологій	Гени	Кількість, n (%)				
		Пацієнтів	Ембріонів до трансферу (на одне перенесення)	Трансферів	Вагітностей	Народжень
Бета-таласемія (Гемоглобінпатія бета локус 1)	<i>HBV</i>	61	121 (1,55)	78 (56,9)	20 (25,6)	15 (19,2)
Анемія Фанконі	<i>FANCA</i>	16	40 (1,43)	28 (60,9)	9 (32,1)	6 (21,4)
Імунодефіцитні стани	<i>ATM, BTK, CD40LG, CYBB, FOXP3, IKBKG, RAG1, WAS</i>	35	108 (1,71)	63 (71,4)	23 (36,5)	24 (38,0)
Лейкодистрофії	<i>ASRA, ABCD1, EIF2B2, GALC, PLP1, PSAP, PXMP3, PEX1, SAMHD1</i>	32	71 (1,65)	43 (74,1)	25 (58,1)	26 (60,4)
Патології разом (N = 23)	23	163	351 (1,52)	230 (61,5)	72 (31,1)	59 (26,5)

Примітка. N — кількість.

Єдиним доведеним способом лікування з довгостроковим ефектом за недостатності кісткового мозку і мієлодиспластичного синдрому за СДС є алогенна трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин (ТГСК, HSCT) [206]. Оскільки ТГСК пов'язана з високим ризиком множинних ускладнень, найкращі результати можуть бути отримані під час після алогенних трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин від HLA-ідентичних родинних донорів [207–209]. За відсутності HLA-сумісних сибсів батьки пацієнта мають можливість провести ПГТ-М з HLA-типуванням відбору здорових HLA-ідентичних ембріонів для переносу і народження потенційного донора не тільки без СДС, але і HLA-сумісного з пробандом, для успішної трансплантації кісткового мозку [22].

У дослідженні родини для хворої дитини 6 років з синдромом СДС, з вторинним мієлодиспластичним синдромом не було відповідного HLA-ідентичного донора. Молекулярно-генетичне тестування з секвенуванням за Сенгером дозволило встановити генотип дитини — компаунд-гетерозигота за мутаціями с.183-184TA4CT тас.258 + 2T4C гена *SBDS* (OMIM607444), успадкованими від батьків. З 13 зрілих ооцитів матері було отримано 11 ембріонів, для 8 з яких було проведено дослідження на наявність мутацій в гені *SBDS* і виконано HLA-типування. Аналіз показав, що два ембріона не мали вказаних мутацій та були HLA-ідентичні хворому сибсу. Результатом перенесення одного з них стала доношена вагітність і народження здорової дитини. Пацієнтці було проведено алогенну трансплантацію гемопоетичних стовбурових клітин пуповинної крові разом з кістковим мозком від сибса, що призвело до повного відновлення кровотворної функції і нормальних показників крові через 160 діб після трансплантації [204].

Таким чином, ПГТ-М з дослідженням анеуплоїдії є перспективною можливістю народження здорового HLA-ідентичного донора для лікування вроджених і набутих хвороб, що потребують трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин, без ризику для дитини-донора [22, 55]. Народження здорової дитини як HLA-сумісного донора в родині хворою дитиною дає

можливість порятунку хворого сибса, так як сімейні пари зазвичай планують мати ще одну здорову дитину, що досягається за допомогою ПГТ [210].

5.1.5 ПГТ моногенних захворювань, зумовлених мутаціями *de novo*.

Особливістю родин без обтяженого сімейного анамнезу, з вперше встановленим генетичним захворюванням у одного з подружжя або у хворої дитини може бути виявлення мутації *de novo* в гонадах батьків.

Традиційні підходи до ПГТ-М зазвичай не можуть використовуватися у таких випадках внаслідок відсутності інформації про її походження, і, крім того, відповідні гаплотипи недоступні для аналізу характеру успадкування такої мутації в зразках, які можна отримати за дослідження ембріонів або ооцитів [211–213]. Через недостатню поінформованість, труднощі проведення генеалогічного аналізу або за відсутності хворого члена родини встановити походження мутації і проаналізувати характер успадкування мутантних і нормальних алелей в ооцитах і ембріонах складно. Тому ПГТ-М для патологій, обумовлених мутаціями *de novo*, зазвичай спрямована на пошук можливого походження мутації і відповідних гаплотипів як основи для розробки алгоритму ПГТ для кожної окремої сім'ї, що дозволяє проведення ефективної селекції ооцитів і ембріонів.

Аналіз даних щодо 152 родини з різними патологіями, пов'язаними з мутаціями *de novo*, для яких було проведено ПГТ-М, показав, що 88,2 % ($n = 134$) порушень визначалися домінантними, 4,0 % ($n = 6$) — рецесивними і 7,8 % ($n = 12$) — Х зчепленими мутаціями *de novo*. У сім'ях з домінантними мутаціями 51,5 % ($n = 69$) мали батьківське походження, 42,5 % ($n = 57$) — материнське походження і 6,0 % ($n = 8$) були встановлені вперше у хворих дітей. У трьох сім'ях з рецесивними мутаціями 50 % ($n = 3$), було встановлено їх батьківське походження, і патології були представлені муковісцидозом, спінальною м'язовою атрофією і анемією Фанконі; в одній, 16,7 % ($n = 1$) — материнське, тромбоастенія Гланцмана. У двох родин, 33,3 % ($n = 2$), мутації *de novo*, що обумовлюють муковісцидоз і анемію Фанконі, були виявлені у хворих дітей. У 12 сім'ях з Х-зчепленими

мутаціями 58,3 % ($n = 7$) мали материнське походження і були пов'язані із хронічним гранульоматозом, хворобою Пеліція–Мерцбахера і синдромом Блоха-Сульцбергера, 41,7 % ($n = 5$) були визначені у хворих дітей з синдромом Віскотта-Олдріча, хронічним гранульоматозом, атипичним синдромом Ретта і синдромом Ретта [31, 214].

Розробка підходів до ПГТ мутацій *de novo* залежала від їх походження (рис. 5.1), і, відповідно, в таких випадках було необхідним проведення аналізу ДНК батьків і хворих дітей для детекції мутації і поліморфних маркерів за допомогою тестування різних біологічних зразків (рис. 5.1), що забезпечувало інформацію про нормальні і мутантні гаплоти для відстеження мутації.

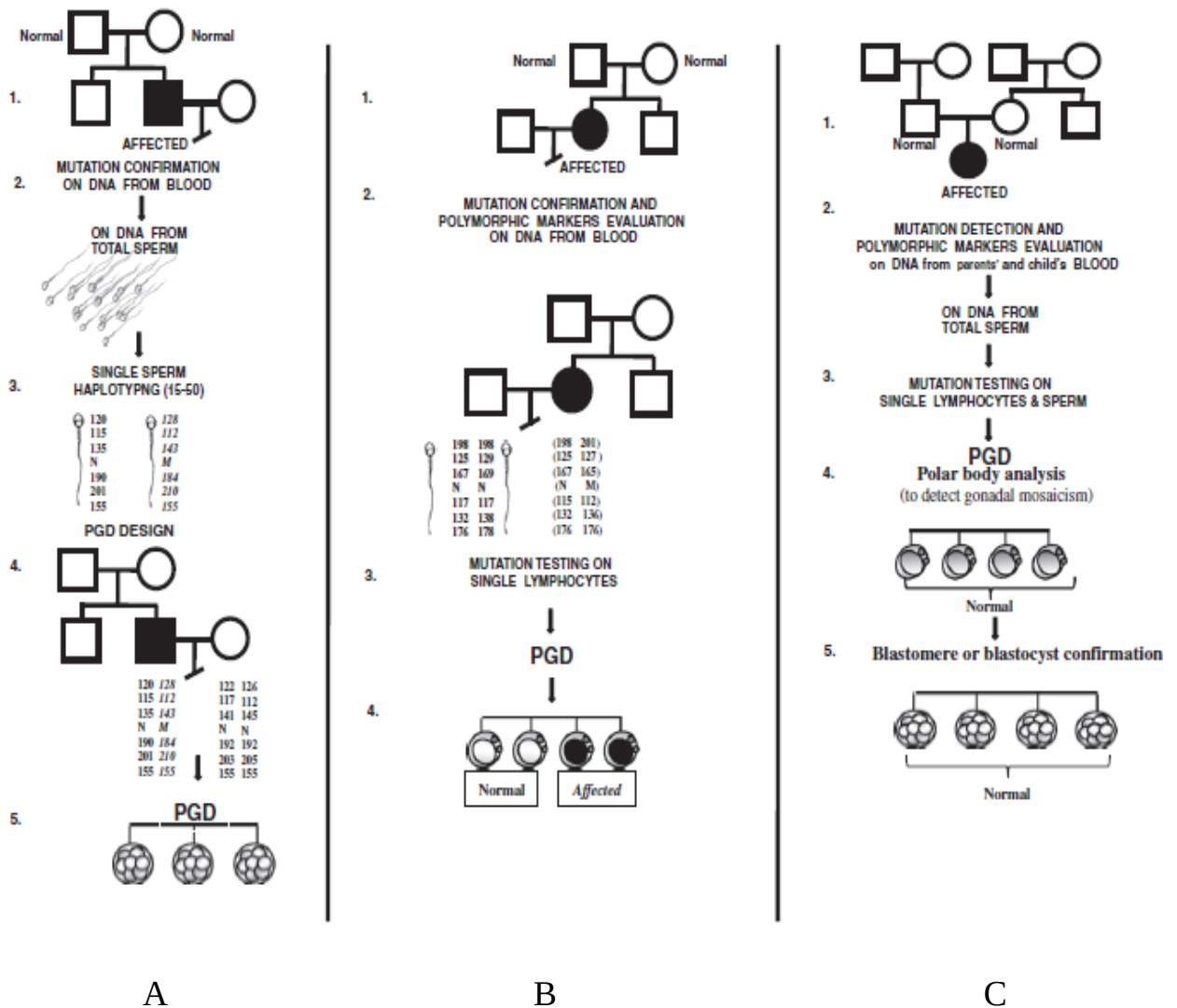


Рис. 5.1. ПГТ у родинях за умов мутацій *de novo* різного походження [214].

У зв'язку з цим доцільним було оцінити результативність досліджень різних біологічних зразків від батьків обох статей за різних патологій.

На рис. 5.1 А ми представили родину з мутацією *de-novo*, яка була виявлена у батька: (1) родовід з двома поколіннями; (2) дослідження мутацій в зразках ДНК, яку виділено із зразків крові і сперми; (3) тестування одиничних сперматозоїдів партнера для встановлення нормальних і аномальних гаплотипів, необхідних для підготовки циклу; (4) ампліфікація ДНК пацієнта для виявлення найбільш інформативних маркерів ПГТ; (5) ПГТ бластомера або біопсія бластоцисти для комбінованого аналізу мутацій і зчеплення.

У частині рис. 5.1 В зображено сім'ю з мутацією *de novo* у матері (пацієнтки): (1) родовід з двох поколінь; (2) дослідження мутацій в зразках ДНК, яку виділено з зразка крові або букального епітелію і окремих лімфоцитів. Гаплотипи батька аналізуються за допомогою окремих сперматозоїдів для більш точного прогнозування генотипів ембріонів; (3) ПГТ першого і другого полярних тілець для виявлення ооцитів без мутації *denovo* і визначення материнських гаплотипів; (4) дослідження бластомера або бластоцисти для підтвердження результатів дослідження.

У частині рис. 5.1 С наведено сім'ю з хворою дитиною: (1) родовід з трьох поколінь; (2) дослідження мутації *de novo* в зразках ДНК дитини, виділеної з зразка крові або букального епітелію. Пошук мутації *de-novo* в зразках ДНК, виділених із зразків крові батьків і сперми (3) оцінка мутацій в одиничних лімфоцитах і тестування сперматозоїдів для виключення гонадного мозаїцизму батька; (4) ПГТ з аналізом полярного тільца для виявлення можливого гонадного мозаїцизму матері; (5) аналіз бластомера або бластоцисти для підтвердження відсутності мутації.

Аналіз результатів досліджень показав, що в загальній групі моногенних патологій переважають домінантні захворювання, відповідно до високої швидкості виникнення домінантних мутацій. Співвідношення кількості лікувальних циклів ДРТ, кількості ембріонів, трансферів,

отриманих здорових вагітностей і народжених дітей, що припадають на одного пацієнта, зіставні для обох статей як за домінантних, так і за рецесивних мутацій *de novo* (табл. 5.4).

Таблиця 5.4

**Аналіз результатів ПГТ-М у сім'ях з моногенними патологіями,
які зумовлені мутаціями *de novo* різного походження**

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

Примітки: 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 статистично значущої різниці між зазначеними співвідношеннями для жінок з домінантними і рецесивними мутаціями ($p = 0,376$), і для чоловіків ($p = 0,998$). Отримані показники свідчать про те, що

використані різні методики для дослідження різних біологічних зразків пацієнтів обох статей дають співставні результати за показниками ембріонів і народжених здорових дітей.

Отримана нами 100 % точність ПГТ-М для мутацій *de novo* в загальній групі родин підтверджується проведенням 86 % успішної ідентифікації здорових ембріонів для селекції і перенесення 403 ембріонів без мутації *de novo* в 239 циклах (в середньому 1,7 ембріона на перенесення), розвитком 119 (49,8 %) здорових вагітностей і народженням 124 дітей без патологій.

Отримані результати узгоджуються з даними, представленими раніше колегами щодо показників точності у 99,4 % за цикл перенесення в загальному досвіді ПГТ-М для менделевських захворювань, який включав 2 028 циклів ПГТ-М, виконаних для 227 генетичних захворювань, що призвело до 677 здорових вагітностей (частота настання вагітності 40,2 % на цикл перенесення) і народженню 690 здорових дітей [215, 216].

Слід зазначити, за даними літератури, що з декількох випадків хибного результату діагностики один, наприклад, був пов'язаний з невиявленим випаданням алеля (ADO) в ПГТ-М при виключенні мутацій, пов'язаних з муковісцидозом, і мутантний ембріон, компаунд, був помилково ідентифікований як здоровий. Також у літературі були відзначені випадки з прогнозованою низькою точністю позитивного результату на підставі недостатньої кількості маркерів, що залишало можливість для випадіння алеля в ПГТ-М для синдрому ламкою X-хромосоми, м'язової дистрофії та бета-таласемії, коли пари приймали рішення про перенесення тестованих ембріонів [215].

Про високу точність підходів ПГТ-М для мутацій *de novo* повідомлялося також авторами ще одного масштабного дослідження сімей з моногенними патологіями [21], в якому частота помилкового діагнозу склала 0,6 % (1 443 цикли ПГТ-М) і спостерігалася для випадків м'язової дистрофії і спінальної м'язової дистрофії [217].

Таким чином, тип успадкування мутацій та види біологічних зразків досліджених осіб не вносять істотного впливу на точність проведення ПГТ-М для мутацій *de novo*.

5.2 Оптимізація преімплантаційного генетичного тестування для попередження моногенної патології

ПГТ моногенних захворювань засновано на тестуванні ооцитів або ембріонів для попереднього відбору та перенесення генетично нормальних ембріонів пацієнту для розвитку здорової вагітності і народження здорової дитини. Як і за ПГТ-А, за можливості хромосомних порушень в сім'ї, його проводять шляхом дослідження або окремих бластомерів, отриманих з доімплантаційних ембріонів на стадії восьми бластомерів, або декількох клітин з бластоцист, або жіночих гамет шляхом видалення і генетичного аналізу першого і другого полярних тілець. Однак останній підхід непридатний для тестування аномалій батьківського походження, або для визначення статі [203]. Такі дослідження можуть бути проведені за допомогою генетичного аналізу окремих клітин, отриманих з ембріона на стадії дроблення або бластоцисти. В окремих випадках необхідно тестування чоловічих гамет. Таким чином, від особливостей сім'ї та цілей ПГТ-М залежить як вибір підходів до отримання та дослідження того чи іншого біологічного зразка, так і методів генетичного аналізу [218].

5.2.1 Походження мутації і мета дослідження для визначення алгоритму ПГТ-М. Аналіз результатів проведення ПГТ дозволив запропонувати підходи щодо проведення комбінованого тестування мутацій, анеуплоїдії і HLA з урахуванням походження та типу успадкування мутації, віку пацієнтів та мети родини [31].

Під час дослідження домінантної мутації або Х-зчепленої мутації материнського походження і анеуплоїдії ми виконували тестування першого і другого полярних тілець, у тому випадку, якщо тестування на анеуплоїдію було необхідним через пізній репродукційний вік матері (рис. 5.2).

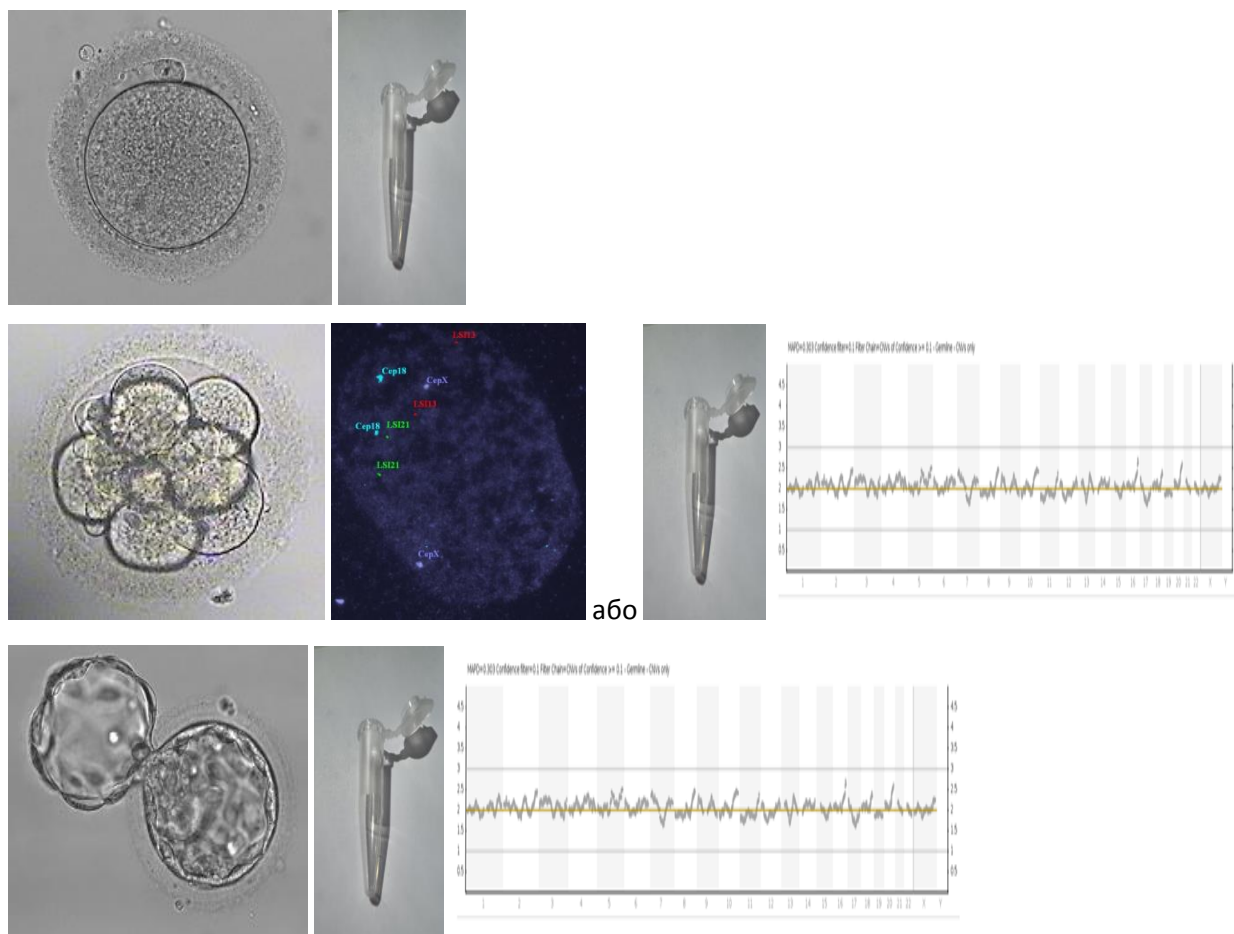


Рис. 5.2. Материнське походження мутації, тестування домінантної мутації або Х-зчепленої і анеуплоїдії.

Ембріони, у яких передбачається відсутність материнських мутацій, додатково тестуються на анеуплоїдії з використанням FISH або секвенування наступного покоління, у той час як ембріони з сумнівними результатами щодо наявності мутації досліджуються з використанням мультиплексної гніздової або напівгніздової ПЛР для одночасного тестування сайтів мутацій, пов'язаних з їх поліморфними маркерами і STR хромосом 13, 16, 18, 21, 22, X і Y, для виключення анеуплоїдій (рис. 5.2). Як альтернативу, можливо використати повногеномну ампліфікацію для біоптата бластомерів або клітин ТЕ, як для тестування анеуплоїдії 24-хромосом, з використанням продукту повногеномної ампліфікації, так і для аналізу мутацій і зчеплення.

Під час дослідження домінантної мутації батьківського походження і за умов пізнього репродукційного віку матері на першому етапі ми вважали доцільним провести тестування першого і другого полярних тілець щодо

виключення анеуплоїдії, та після цього — аналіз бластомерів ембріонів без анеуплоїдії на батьківські мутації і поліморфні маркери (рис. 5.3). В якості альтернативи, для виключення анеуплоїдії всіх хромосом можливе виконання повногеномної ампліфікації біоптата бластомерів або клітин ТЕ, як для NGS або а-CGH, з використанням продукту повногеномної ампліфікації, так і для мутацій і поліморфних маркерів (рис. 5.3).

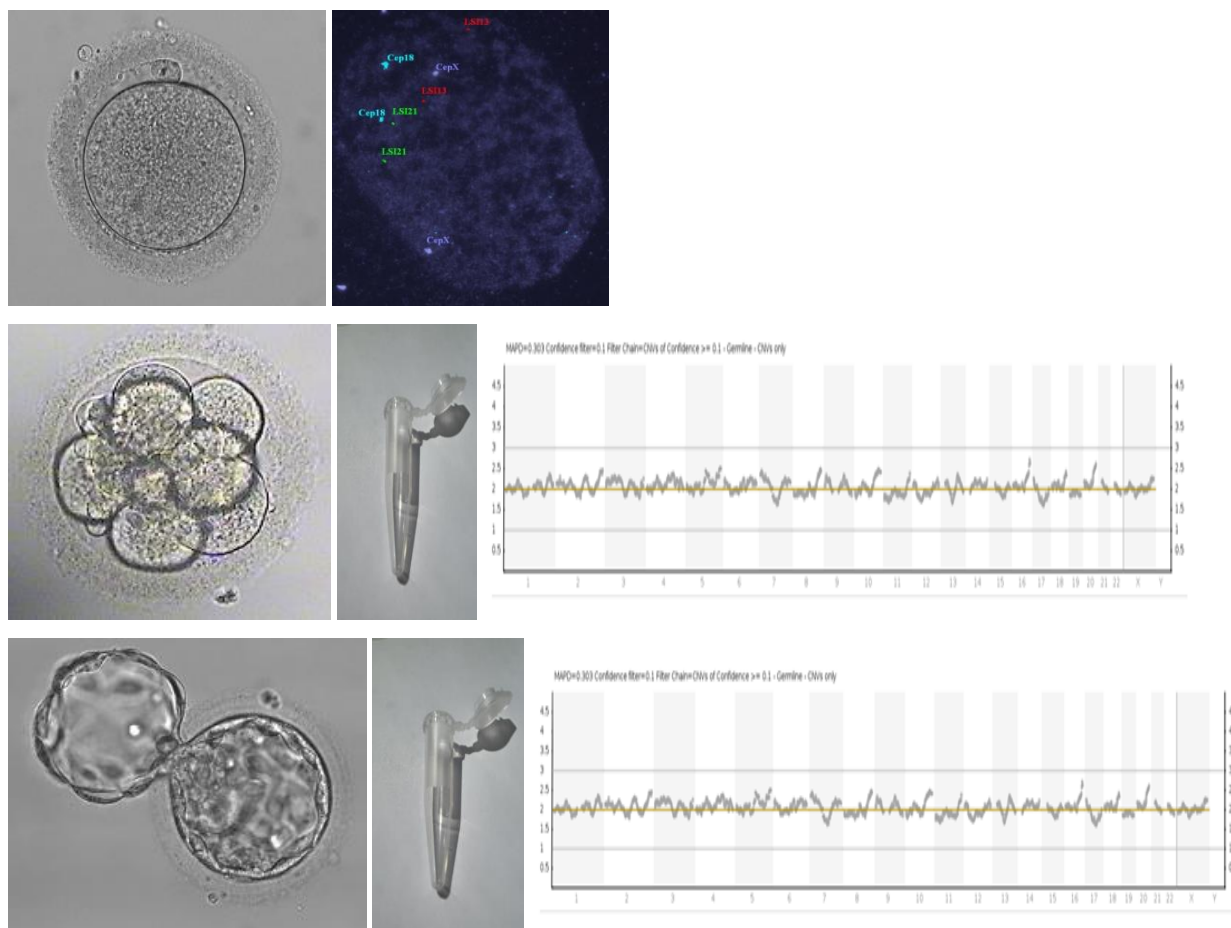


Рис. 5.3. Батькове походження мутації, тестування домінантної мутації і анеуплоїдії.

У випадку аутомно-рецесивного захворювання і пізнього репродукційного віку матері першу чергу проводили виключення анеуплоїдії першого і другого полярних тілець з подальшим аналізом бластомерів ембріонів без анеуплоїдії на наявність мутацій і поліморфних маркерів (рис. 5.4). Материнська мутація також оцінюється за допомогою аналізу першого і другого полярних тілець, якщо у батьків встановлені різні мутації, і

ембріони без мутацій можуть бути додатково протестовані на батьківську мутацію разом зі зчепленими маркерами.

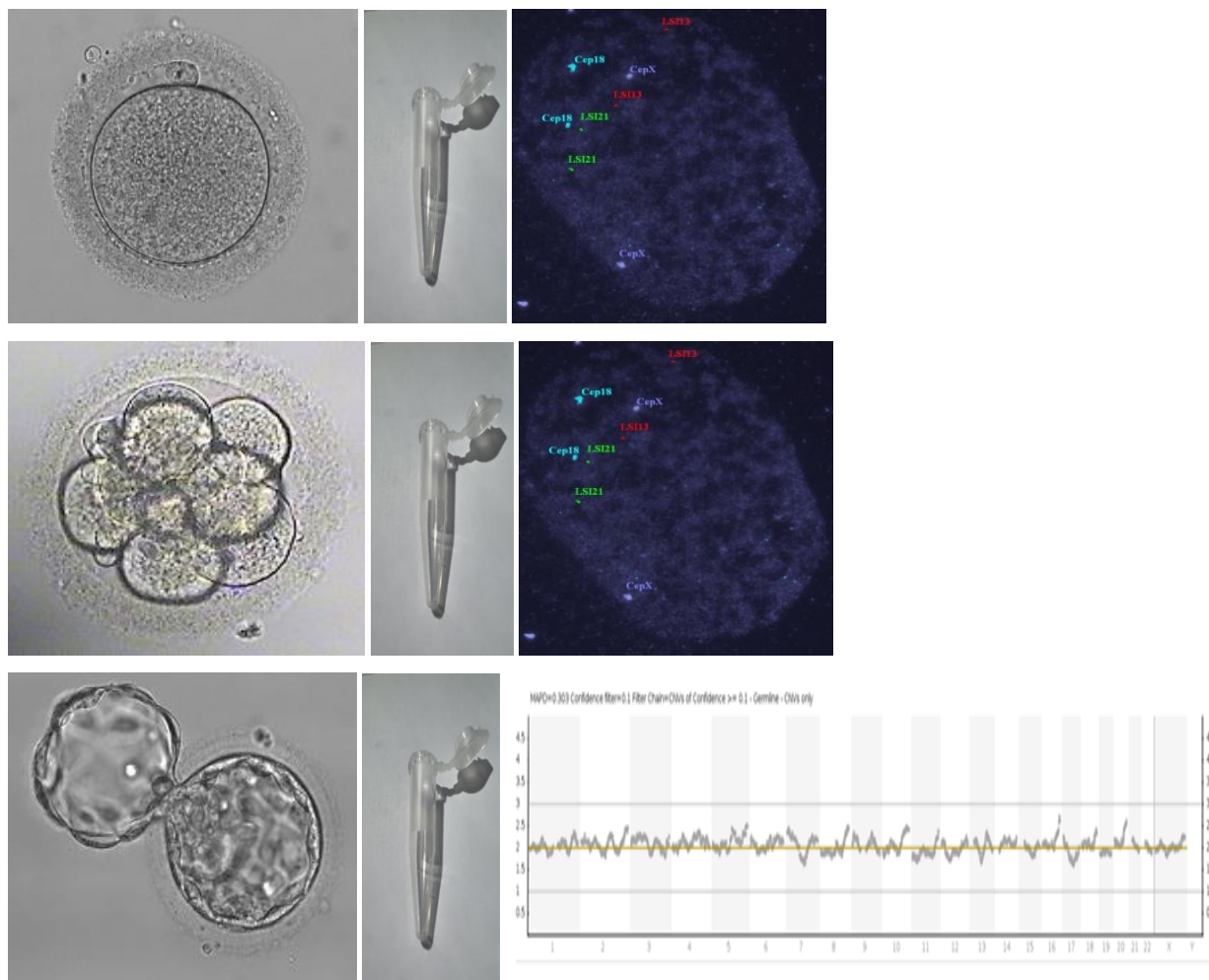


Рис. 5.4. Тестування рецесивних патологій і анеуплоїдій.

Усі ембріони, отримані з ооцитів з сумнівними результатами аналізу першого і другого полярних тілець, досліджуються з використанням мультиплексної гніздової або напівгніздової ПЛР для одночасного тестування сайтів мутацій, пов'язаних з їх поліморфними маркерами хромосом 13, 16, 18, 21, 22, X і Y для виключення анеуплоїдій, або проводиться повногеномна ампліфікація і NGS або a-CGH, як для тестування анеуплоїдії 24-хромосом, з використанням продукту повногеномної ампліфікації, так і для аналізу мутацій і зчеплення (рис. 5.4).

Під час дослідження мутації, анеуплоїдії і HLA-типування доцільно використання алгоритму, аналогічному тому, який застосовується для детекції

рецесивних патологій і анеуплоїдії, за винятком того, що HLA-типуювання виконується на всіх бластомерах в поєднанні з аналізом мутацій або STR-типуюванням анеуплоїдії або NGS або а-CGH-типуюванням для тих самих ембріонів (рис. 5.5).

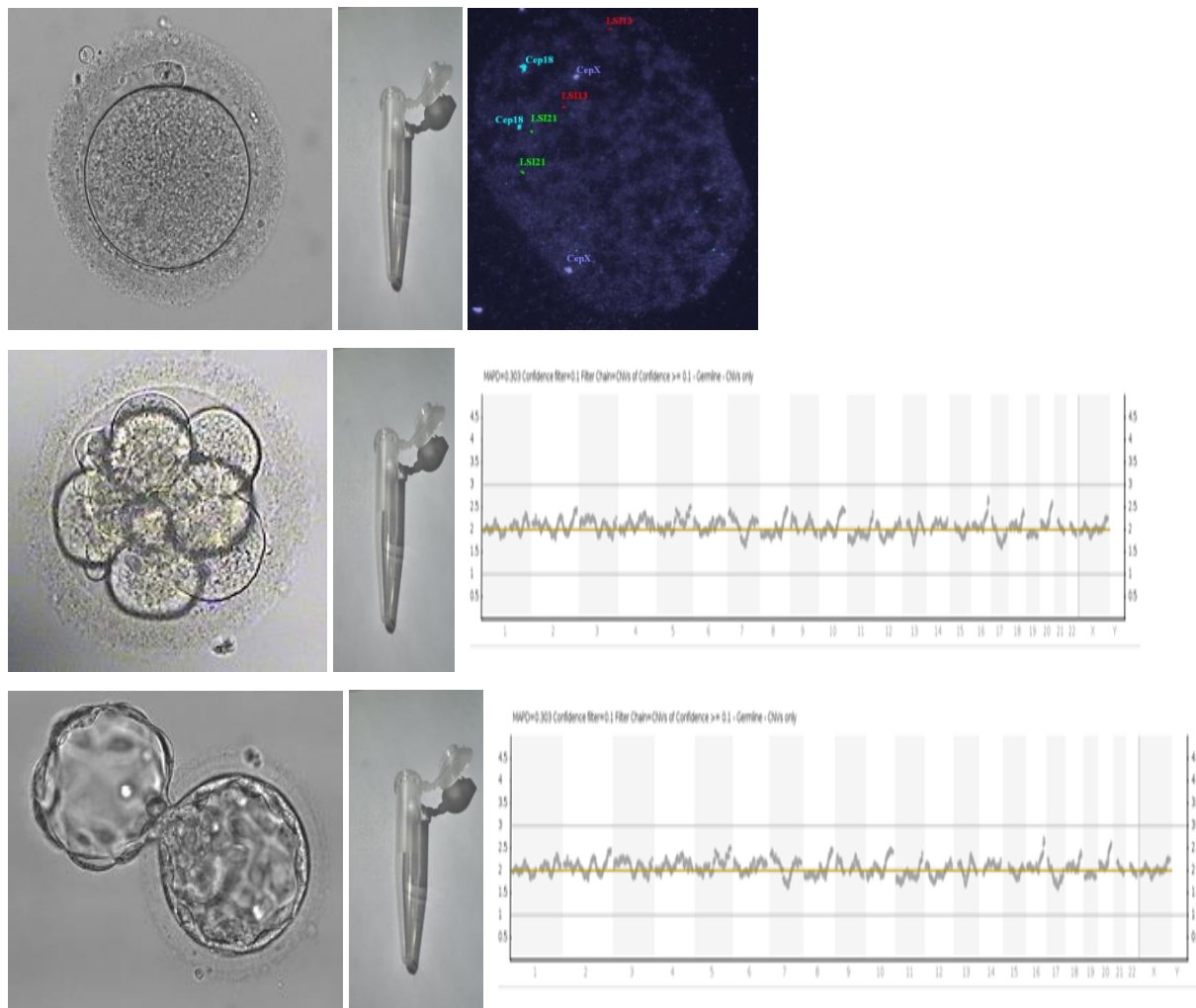


Рис. 5.5. Тестування мутації, анеуплоїдії і HLA-типуювання.

HLA-типуювання в поєднанні з ПЛР-тестуванням на анеуплоїдії (рис. 5.6) доцільно виконувати або за допомогою аналізу полярних тілець методом FISH, з подальшим HLA-типуюванням на бластомерах, або за допомогою комбінованого тестування анеуплоїдії всіх хромосом і HLA-типуювання в продукті повногеномної ампліфікації, отриманому на першому етапі NGS або а-CGH дослідження (рис. 5.6).

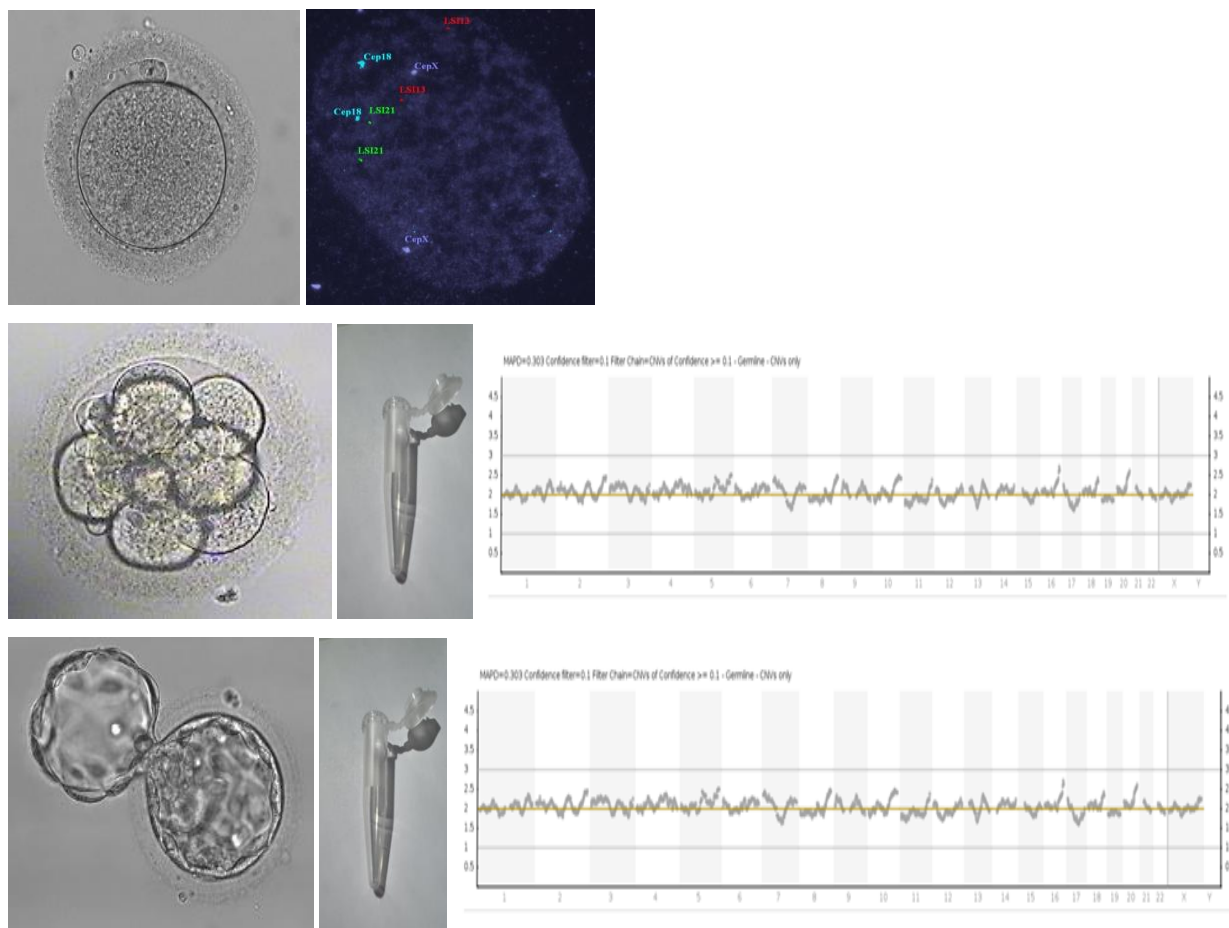


Рис. 5.6. Тестування анеуплоїдії і HLA-типування.

Таким чином, підхід з можливістю комбінування тестування 24 хромосом для виключення анеуплоїдії і мутацій, що обумовлюють моногенну патологію, доцільно використовувати під час аналізу будь-яких менделевських захворювань, в тому числі і для родин, які потребують преімплантаційного HLA-типування.

5.2.2 Приклади визначення мутацій за ПГТ-М. Приклад 1. У окремих родин, у разі складності планування ПГТ ембріона за умови юридичних, релігійних чи етичних обмежень, доцільне виконання дослідження на основі біопсії гамет із проведенням генетичного аналізу полярних тілець. Такий підхід дає можливість відбору гамет, які містять алелі без мутації, для запліднення і подальшого ембріотрансферу. Прикладом є ПГТ-М, проведене нами для кількох сімей з групи ризику розвитку бета-таласемії, зумовленої мутаціями в гені *HBB*, які найчастіше поширені у

вихідців з країн Кавказу, Середньої Азії, Близького Сходу, Середземномор'я і Західної Африки.

Дослідження було проведено в 12 клінічних циклах (вісім циклів для мутації IVS1-110, і чотири — для мутації IVSII -745), з використанням біопсії першого (I) і другого (II) полярних тілець (ПТ). Ооцити були отримані після стандартної процедури стимуляції в рамках запліднення *in vitro*, у них були відібрані перші полярні тільця (ПТ) для аналізу шляхом ПЛР, другі полярні тільця відбирали після запліднення. Так як для запліднення використовується метод ICSI, це виключає можливість контамінації ДНК другого полярного тільця генетичним матеріалом сперматозоїда.

Результати визначення генотипу 118 ооцитів за полярними тільцями для мутацій гена бета-глобіну IVSII-745 і IVSI-110, і поліморфні маркери, наведено в табл. 5.5.

У цілому, більшість ооцитів, виходячи з аналізу першого полярного тільця (ПТ), були гетерозиготними за мутантними алелями — 87 з 118. Частота кросинговеру склала 73,7 %, і, таким чином, був встановлений діагноз щодо 31 ооцита або у 26, 3 % від загальної кількості ооцитів, аналізованих за першим полярним тільцем.

Діагноз щодо 86 ооцитів з 118, перевірених на наявність мутацій гена бета-глобіну шляхом дослідження першого полярного тільця підтвердився за одночасної ампліфікації зчеплених поліморфних маркерів 5 'ГлобінSTR і 3' ГлобінSTR.

Гетерозиготними після дослідження за поліморфними маркерами виявилися 57 ооцитів з 76, частота рекомбінації склала 75,0 %. Відповідно, були отримані подібні результати і підтверджений діагноз щодо 19 ооцитів або 25,0 % від загальної кількості ооцитів, проаналізованих за першим полярним тільцем щодо мутацій гена бета-глобіну, які виявилися гомозиготними.

**Двоетапний аналіз полярних тілець і результати дослідження
ембріонів з сімей з групи ризику щодо таласемії**

Мутація /локус	Усього ооцитів/ ампліфі- кацій	Ооцити/після ПЛР ІПТ		Ооцити /після ПЛР ІПТ	Ооцити/після ПЛР І ПТ та ІІ ПТ		Ембріони	
		Гетер- озиготні	Гомози- готні		Разом	Число випадіння алелей	Дос- лід- жені	Під- тверд- жені
IVS II-745	54	43	11	49	38	1	25	25
IVS I-110	64	44	20	40	40	4	26	26
Разом	118	87	31	89	78	5	51	51
5' Глобін STR	76	57	19	61	54	2	39	39
3' Глобін STR	10	8	2	10	8	1	5	5
Разом	86	65	21	71	62	3	44	44

Під час проведення дублюючих одночасних ампліфікації зчеплених поліморфних маркерів гетерозиготними виявилися 8 ооцитів з 10. Частота рекомбінації склала 80,0 %. Відповідно, було встановлено діагноз для 2 ооцитів або у 20,0 % від загальної кількості ооцитів, проаналізованих за першим полярним тільцем, які бути визначені як гомозиготні.

У цілому, гетерозиготними після проведення дослідження за поліморфними маркерами виявилися 65 ооцитів з 86. Частота кросинговеру склала 75,6 %. Був підтверджений діагноз щодо 21 ооцита або у 24,4 % від загальної кількості ооцитів, аналізованих за першим полярним тільцем.

Генотип гамет, що формуються з гетерозигот, можливо оцінити тільки шляхом дослідження їх другого полярного тільца (ІІПТ). З 89 ооцитів, для

яких було проведено аналіз другого полярного тільця, 78 були перевірені методами і першого, і другого полярних тілець. Отримані генотипи цих ооцитів представлено в табл. 5.6.

Таблиця 5.6

Двоетапний аналіз полярних тілець, що визначає генотип ооцита після першого і другого мейотичного поділу

Мутація /локус	Ооцити /після ПЛР I ПТ та II ПТ	Ооцити гомозиготні/після ПЛР ПТ		Ооцити гемізиготні/після ПЛР ППТ		Всього ооцитів з визначеними генотипами	
		Нормальні	Мутантні	Нормальні	Мутантні	Нормальні	Мутантні
IVS II-745	38	1	8	11	16	12	24
IVS I-110	40	5	7	14	14	19	21
Разом	78	6	15	25	30	31	45
5' Globin STR	54	11	2	20	19	31	21
3' Globin STR	8	1	1	3	3	4	4
Разом	62	12	3	23	22	35	25

Остаточний висновок під час аналізу мутації IVS II-745 було зроблено по відношенню до 36 (94,7 %) ооцитів, від загальної кількості в 38 ооцитів, проаналізованих за першим і другим полярними тільцям (ПТ і ППТ). Більшість ооцитів, виходячи з аналізу першого і другого полярних тілець (ПТ і ППТ), виявилися мутантними (24 з 38 аналізованих або 63,2 %). Відповідно, аналіз генотипу 12 ооцитів, або 36,8 %, не показав мутації IVS II-745, тому вони можуть бути придатними для ембріотрансферу (табл. 5.6).

У результаті аналізу мутації IVS 1-110 було визначено генотипи 40 ооцитів, тобто всіх, проаналізованих за ППТ і ШПТ. Трохи більше половини ооцитів, виходячи з аналізу ППТ і ШПТ, виявилися мутантними — 21 ооцит або 52,5 %. Відповідно, 19 ооцитів або 47,5 % в своєму генотипі не містили мутації таласемії IVS 1-110 і були придатними для перенесення.

Загальна кількість ооцитів, придатних для ембріотрансферу, що не містять мутацій гена бета-глобіну IVS 1-110 та IVS 1-110, після перевірки другого полярного тільця, збільшилася з 6 до 31 або до 40,8 % від загальної кількості ооцитів з встановленим генотипом за рахунок додавання 25 гемізіготних ооцитів, що не містять мутантного аллеля, але які мали гетерозиготне перше полярне тільце.

З 89 ооцитів, у яких було проведено аналіз другого полярного тільця на наявність мутацій гена бета-глобіну, 71 ооцит одночасно досліджувався ще й за поліморфними маркерами, і для кожного з них діагнози повністю збіглися. Подібний результат отримано і у випадку одночасної ампліфікації зчеплених поліморфних маркерів під час аналізу генотипу перших і других полярних тілець.

Генотип був остаточно встановлений після одночасної ампліфікації зчеплених поліморфних маркерів у 52 ооцитів або в 96,3 % від їх загальної кількості (54 ооцити), проаналізованих за ППТ і ШПТ. Менше половини ооцитів, виходячи з аналізу першого і другого полярних тілець, виявилися мутантними — 21 ооцит або 40,4 %. Відповідно, 31 ооцит або 59,6 %, були придатними для перенесення, що повністю підтвердило результати досліджень мутацій гена бета-глобіну в кожному конкретному випадку.

У разі одночасної ампліфікації зчеплених поліморфних маркерів був остаточно підтверджений діагноз щодо всіх 8 ооцитів, тобто всіх від загальної кількості аналізованих за ППТ і ШПТ. Половина ооцитів, виходячи з аналізу ППТ і ШПТ, виявилася мутантними — 4 ооцити або 50,0 %, а інша частина — 4 ооцити або 50,0 %, могли бути використані для ембріотрансферу. Загальна кількість ооцитів, придатних для перенесення

після проведення дослідження за поліморфними маркерами, склало 35 або 56,5 % від загальної кількості ооцитів з певним генотипом.

Вивчення 161 аспірованих бластомерів з 37 ембріонів (табл. 5.7), гетерозиготних за мутаціями бета-глобіну IVS II-745 і IVS I-110, показало частоту випадання обох алелів у бластомерів на рівні 18,6 % (табл. 5.7).

Таблиця 5.7

**Випадання алелей у гетерозиготних за мутаціями гена *HBB* бластомерів
в результаті ампліфікації**

Мутація (локус)	Перевірено ембріонів	Аспіро- вано	Ампліфі- кація A1 и A2	Ампліфі- кація A1	Ампліфі- кація A2	ADO
IVS II-745 (Ц > Г)	20	85	74	80	79	11
IVS I-110 (Г > А)	17	76	58	68	66	18
Разом:	37	161	132	148	145	30
5' Globin STR	10	51	41	45	47	10

Примітки: Б — бластомер, A1, A2 — алелі, ADO — випадання алеля.

З 161 бластомера, отриманого від 37 ембріонів, ампліфікація обох алелів відбувалася у 132 з 161 (81,4 %) бластомерів, аналізованих за дослідженими мутаціями, та у 41 з 51 (81,9 %) бластомерів, аналізованих за поліморфними маркерами, що характеризує величину ризику помилкового діагнозу під час ПГТ на основі бластомерів. Нами була відзначена також більш висока частота випадання алелей в бластомерах, ніж у випадку ППТ, але ця різниця не досягла рівня статистичної значущості. Таким чином, застосування одночасної ампліфікації зчеплених поліморфних маркерів актуально для зниження кількості невиявлених випадань алелей і ризику встановлення хибного діагнозу, особливо у випадках, коли батьки є носіями різних мутацій у гені бета-глобіну.

Результати подальшого дослідження ембріонів, отриманих з ооцитів, які за результатами аналізу ППТ і ППТ тілець очікувалися як такі, що мають генетичні зміни, показали, що передбачені генотипи ембріонів підтверджуються в усіх випадках для мутантних алелів і у всіх випадках для поліморфних маркерів.

Таким чином, з 78 ооцитів, досліджених за ППТ і ППТ, були ідентифіковані 30 ембріонів, передбачених як такі, що мають нормальний материнський аллель. Результатом ембріотрансферів в 11 циклах стали дві вагітності та в обох випадках було підтверджено відсутність мутації материнського бета-глобіну (табл. 5.8).

Таблиця 5.8

ПГТ мутацій, які зумовлюють таласемію

Мутація	Пацієнт/цикл	Кількість			
		Ооцитів	Ооцитів з I+II ПТ	Нормальних ембріонів	Перенесених ембріонів
IVS II-745	1/4	66	38	12	4
IVS I-110	5/8	64	40	18	7
Разом	6/12	130	78	30	11

Визначення генотипу 51 ембріона, які розвинулися з ооцитів, перевірених за ППТ і ППТ, підтвердило попередній діагноз, запропонований після аналізу полярних тілець, у всіх випадках, крім одного, що показує точність аналізу за ППТ і ППТ для ПГТ бета-таласемії.

Приклад 2. Визначення алгоритмів ПГТ для 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, для ідентифікації нормальних і мутантних гаплотипів для відстеження мутації.

Як приклад, можна розглянути сім'ю, для якої розроблено стратегію ПГТ-М за мутації *de novo* — делеції інтрона 27–38, в гені *NF1*, материнського походження (рис. 5.7).

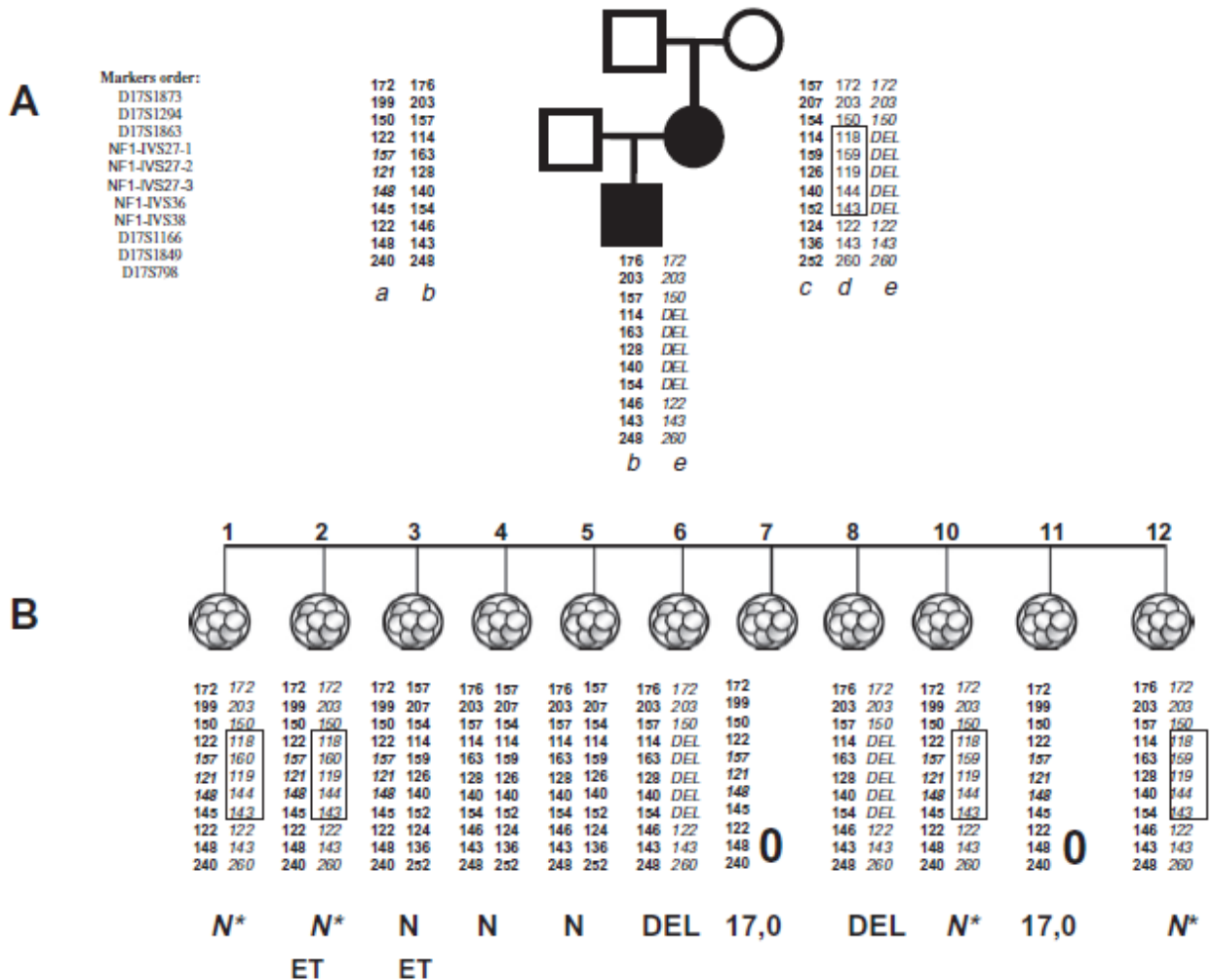


Рис. 5.7. А. Родовід сім'ї з хворим сином, у якого виявлено делецію інтрона 27–38 в гені *NF1*. В. Генетичні характеристики отриманих ембріонів.

Делеція не розпізнається в материнській ДНК, виділеній із зразків крові, хоча встановлені два гаплотипи (с і d) і останній відповідає мутантному гаплотипу у хворого сина, але без делеції. На рис. 5.7 показана «очікувана» делеція в цій «доброякісній» хромосомі, представлений такий же гаплотип, як і у хворого сина, материнський, але без делеції. Фактичний мутантний гаплотип (е) з делецією виявлений в одиничних лімфоцитах матері. Нормальні батьківські гаплотипи (а) і (б) були визначені за допомогою

маркерів, один з них виявлено на нормальній хромосомі сина. В. Результати циклу ПГТ-М, виконаного методом мультиплексної напівгніздової ПЛР на бластомерах з 11 ембріонів. Три ембріона (3, 4 і 5) були визначені як нормальні (N) на підставі наявності материнського нормального гаплотипу (с) і були рекомендовані для ембріотрансферу (ЕТ). Чотири ембріона (1, 2, 10 і 12) успадкували «доброякісний» мутантний материнський гаплотип (d), також прогнозувалися як нормальні (N*) з можливістю перенесення. З решти чотирьох ембріонів у ембріонів 7 і 11 було встановлено моносомію 17, на підставі відсутності материнських алелів. Ембріони 6 і 8 мали делецію, про що свідчила відсутність материнських маркерів в області делеції (DEL). Два ембріони 2 і 3, були перенесені, результатом чого стала здорова вагітність.

Таким чином, алгоритми дослідження можуть відрізнятися в залежності від типу успадкування мутації, статі носія мутації *de novo*, побажань сім'ї щодо можливості тестування тих чи інших зразків в зв'язку з релігійними або соціальними особливостями, але загальний підхід включає ідентифікацію походження мутації *de novo*, пошук можливого гонадного мозаїцизму і відповідних батьківських гаплотипів.

Публікації за темою розділу дисертації:

1. **Верлинский О.** Влияние кроссинговера на распределение генов бета-глобина между полярными тельцами и ооцитом и клинические испытания предимплантационной генетической диагностики с использованием анализа полярных телец. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: Біологія.* 2011. Вип. 14, № 971, С. 77–81. (Дисертант брав участь у розробці методології дослідження, проведенні досліджень, інтерпретації результатів, підготовці статті до публікації).

2. 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. DOI: 10.1038/bmt.2017.46. (Дисертант брав участь у проведенні досліджень, у інтерпретації результатів).

3. 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. (Дисертант брав участь у розробці методології дослідження, проведенні досліджень, інтерпретації результатів, підготовці статті до публікації).

4. 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: 10.1016/j.rbmo.2011.01.005. (Дисертант брав участь у розробці методології дослідження, проведенні досліджень, інтерпретації результатів, підготовці статті до публікації).

5. **Верлинський О. Ю.**, Гонтар Ю. В., Ільїн І. Є., Федота О. М. Біоетичні аспекти допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). *Біоетика та біобезпека: мультидисциплінарні аспекти : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків, 23–24 трав. 2017 р.* Харків, 2018. С. 40–41.

6. Kuliev A., Rechitsky S., **Verlinsky O.** Atlas of preimplantation genetic diagnosis. 3rd ed. London : CRC Press, 2014. 328 pp. DOI: 10.1201/b16719. (Дисертант брав участь у розробці методологій досліджень, проведенні досліджень, інтерпретації результатів, підготовці монографії до друку).

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Зрілий вік батьків пов'язаний зі зниженням фертильності та ризиком генетичних порушень, але в 95 % процедур ЗІВ генетичне тестування ембріонів не проводиться [1]. У популяційному аспекті, ослаблення тиску відбору проти окремих генотипів чи каріотипів призведе до підвищення їхньої поширеності серед населення, та, як наслідок, наявним буде не тільки «генетичний тягар», але і додаткове економічне та соціальне навантаження [5]. З іншого боку, аналіз механізмів виникнення генетичних порушень дає можливість розширити уявлення щодо процесів розвитку організму на різних етапах онтогенезу [4, 6].

В останні десятиліття в усіх країнах світу, в яких застосовуються ДРТ, відбувається переоцінка існуючих етичних, моральних і правових уявлень про відносини між суспільством, фахівцями, пацієнтами та іншими учасниками репродукційних технологій — донорами клітин та ембріонів, юридичними та біологічними батьками, сурогатними матерями, дітьми, які з'явилися в програмах ДРТ. Саме тому сучасні перспективи репродукційного життя родини доцільно планувати з урахуванням генетичних, етнічних, релігійних, культурологічних та юридичних аспектів [88–94]. Оскільки для окремих родин можливості ДРТ сприяють народженню здорових дітей, уявляється доцільним оптимізувати методологію допомоги родинам з найбільш поширеними та інтернаціональними генетичними проблемами з урахуванням їхніх особливостей, керуючись рекомендаціями науково-практичних спільнот, правовими та етичними положеннями країни, технологічними можливостями дослідників, попереднім досвідом колег [7, 31–34, 83, 87, 102–107].

Визначення генетичних особливостей носіїв транслокацій дозволило окреслити низку позицій, які можливо врахувати під час планування ПГТ-А/СП та ПГТ-М.

ПГТ ембріонів доцільно проводити на п'яту добу розвитку, коли можливість відбору життєздатних ембріонів вища, а ймовірність пошкодження ембріона — нижча, за відсутності юридичних обмежень щодо отримання біологічного матеріалу ембріонів для проведення ПГТ. У випадку релігійних обмежень щодо дослідження ембріона можливо проведення ПГТ полярних тілець.

Оцінка якості зиготи за морфологічними критеріями важлива не тільки для прогнозу розвитку ембріона, але й для планування типу протоколу стимуляції суперовуляції. Особливо це стосується родин, в яких можливість отримання ембріонів або їхня кількість та якість обмежені. Доцільно розглянути жіночу стать носія транслокації як фактор зниження ймовірності розвитку клінічної вагітності та народження здорових дітей. Також важливо рекомендувати фахівцям використати інформацію щодо статі потенційного батька-носія транслокації під час вибору технологічних та клінічних протоколів. Вік потенційних батьків з родини носія транслокації важливо враховувати як фактор ризику виникнення анеуплоїдії ембріонів та проводити скринінг 24 хромосом ембріонів для їхньої подальшої селекції та переносу.

Вважаємо корисним визначити типи хромосомних перебудов, пов'язаних зі зниженням можливості отримання еуплоїдних ембріонів, збалансованих за транслокацією, в умовах країни, регіону та медичного центру.

Під час вибору методів генетичного аналізу для реалізації репродукційного потенціалу родин з носійством транслокацій для детекції транслокацій за ПГТ-СП доцільно застосування GTG-методу для підтвердження хромосомні перебудови батьків та подальше дослідження ембріонів методом FISH в кілька раундів для верифікації сегрегуючої

транслокації або за допомогою NGS. Також доцільним є поєднання методів дослідження ембріонів шляхом ПГТ-А/СП, особливо за їхньої обмеженій кількості та якості та за необхідності відбору ембріона для додаткового виключення ризику розвитку генної патології шляхом ПГТ-М.

Визначення генетичних особливостей родин із групи ризику розвитку моногенної патології показало, що до ПГТ-М звертаються родини з захворюваннями з усіма типами успадкування, але, за результатами досліджень, показник народження здорових дітей на одного пацієнта зіставний для різних захворювань.

Пізній репродуктивний вік пари (< 36 років) потребує одночасного ПГТ-М та тестування 24 хромосом на анеуплоїдії, оскільки наявність зайвої або присутність єдиної хромосоми з пари, яка включає мутацію, створює додаткові ризики народження хворої дитини.

Наявність у родині вроджених і набутих хвороб, потребуючих лікування шляхом аlogenної трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин, є вагомим аргументом щодо HLA-типуювання ембріонів із паралельним виключенням мутацій, які зумовлюють хворобу та тестуванням 24 хромосом на анеуплоїдії.

Стать носія мутації або хворого доцільно врахувати для вибору типу біологічних зразків для дослідження у випадку етичних чи інших обмежень щодо дослідження ембріона. У той же час співвідношення кількості перенесених ембріонів, отриманих здорових вагітностей і народжених дітей до одного пацієнта під час виконання досліджень із залучанням різних біологічних зразків — клітин ТЕ, бластомерів та ПТ зіставні і не мають статистично значущої різниці.

Встановлення мутації *de novo* в гонадах батьків зумовлює необхідність проведення ПГТ-М в парах без обтяженого сімейного анамнезу, у сім'ях з уперше визначеним генетичним захворюванням у одного з подружжя або у хворої дитини. Але для кожної мутації і кожної пари розробляється індивідуальний дизайн ПГТ-М, для того, щоб уникнути можливих

помилкових діагнозів. Наприклад, у деяких випадках необхідно розробити особливий набір зовнішніх праймерів. Підвищення точності аналізу одноклітинної ПЛР забезпечується застосуванням ПЛР у реальному часі, яка знижує частоту випадання алелів майже вдвічі, у порівнянні з класичною ПЛР [31]. Дослідження хромосоми, в якій локалізовано розглянутий ген, актуально для виключення відсутнього або зайвого мутантного алеля, обумовленого моносомією або трисомією цієї хромосоми в біоптаті бластомера, що може мати місце внаслідок високої частоти анеуплоїдій в ооцитах і ембріонах, включаючи мозаїцизм на стадії розщеплення. Застосування цих підходів разом з тестуванням мутації з одним або двома зчепленими маркерами може практично виключити ризик помилкового діагнозу.

У разі батьківського походження мутації, у першу чергу наявність мутації підтверджується шляхом дослідження ДНК батька, виділеної зі зразка крові і зразка сперми, а потім — шляхом одноразового типування сперматозоїдів для визначення пропорції сперматозоїдів, які несуть мутацію *de novo* і відповідні нормальні і мутантні гаплотипи. Також важливо протестувати відповідні зчеплені маркери для партнера, щоб виключити помилковий діагноз, обумовлений можливими загальними материнськими і батьківськими маркерами. У випадках материнського походження мутації, тестування полярних тілець є методом вибору для визначення нормальних і мутантних материнських гаплотипів. Для виключення помилкового діагнозу, спричиненого можливими загальними батьківськими і материнськими маркерами, відповідні батьківські гаплотипи встановлюються шляхом одноразового типування сперматозоїдів. Відповідно, якщо мутація була вперше виявлена у дітей, материнський і батьківський гаплотипи встановлюються, як зазначено вище.

Таким чином, сучасні генетичні знання і технологічні рішення дозволяють урахувати більшість ознак і умов біологічного та соціального характеру під час формування алгоритмів ПГТ-А/СП і ПГТ-М.

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 з 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 транслокацій. 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 характеристиками 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 родинх із моногенними патологіями, що потребують ПГТ-М з HLA-типіванням.

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 статеві 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-acroцентричних 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 репродуктивний 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Peters B. A., Kermani B. G., Alferov O., Agarwal M. R., McElwain M. A., Gulbahce N., Hayden D. M., Tang Y. T., Zhang R. Y., Tearle R., Crain B., Prates R., Berkeley A., Munné S., Drmanac R. et al. Detection and phasing of single base de novo mutations in biopsies from human *in vitro* fertilized embryos by advanced whole-genome sequencing. *Genome Research*. 2015. Vol. 25, No. 3. P. 426–434.
2. Ferraretti A. P., Goossens V., Kupka M., Bhattacharya S., de Mouzon J., Castilla J. A., Erb K., Korsak V., Nyboe Andersen A., The European IVF-monitoring (EIM) Consortium for The European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2009: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*. 2013. Vol. 28, No. 9. P. 2318–2331.
3. Steptoe P. C., Edwards R. G. Birth after the preimplantation of a human embryo. *The Lancet*. 1978. Vol. 312, No. 8085. P. 366. DOI: 10.1016/S0140-6736(78)92957-4.
4. Griffin D. K., Ogur C. Chromosomal analysis in IVF: just how useful is it? *Reproduction*. 2018. Vol. 156, No. 1. P. F29–F50. DOI: 10.1530/REP-17-0683.
5. Ефективні закупівлі: Вперше МОЗ України затвердило всі програми номенклатур до нового року. URL: <https://moz.gov.ua/article/news/efektivni-zakupivli-vpershe-moz-ukraini-zatverdilo-vsi-programi-nomenklatur-do-novogo-roku> (cited: 18.01.19).
6. Wilch E. S., Morton C. C. Historical and clinical perspectives on chromosomal translocations. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018. Vol. 1044. P. 1–14.
7. ESHRE PGT Consortium Steering Committee, Carvalho F., Coonen E., Goossens V., Kokkali G., Rubio C., Meijer-Hoogeveen M., Moutou C., Vermeulen N., De Rycke M. ESHRE PGT Consortium good practice

recommendations for the organisation of PGT. *Human Reproduction Open*. 2020. Vol. 2020, No. 3. P. hoaa021. DOI: 10.1093/hropen/hoaa021.

8. De Rycke M., Berckmoes V. Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disorders. *Genes (Basel)*. 2020. Vol. 11, No. 8. P. 871. DOI: 10.3390/genes11080871.

9. Zhang H., Wang R., Li L., Jiang Y., Zhang H., Liu R. Clinical feature of infertile men carrying balanced translocations involving chromosome 10: Case series and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2018. Vol. 97, No. 15. P. e0452. DOI: 10.1097/MD.00000000000010452.

10. Tšuiiko O., Dmitrijeva T., Kask K., Tammur P., Tõnisson N., Salumets A., Jatsenko T. Detection of a balanced translocation carrier through trophectoderm biopsy analysis: a case report. *Molecular Cytogenetics*. 2019. Vol. 12. P. 28. DOI: 10.1186/s13039-019-0444-2.

11. Aristidou C., Koufaris C., Theodosiou A., Bak M., Mehrjouy M. M., Behjati F., Tanteles G., Christophidou-Anastasiadou V., Tommerup N., Sismani C. Accurate breakpoint mapping in apparently balanced translocation families with discordant phenotypes using whole genome mate-pair sequencing. *PLoS One*. 2017. Vol. 12. P. e0169935. DOI: 10.1371/journal.pone.0169935.

12. Handyside A. H., Kontogianni E. H., Hardy K., Winston R. M. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*. 1990. Vol. 344, No. 6268. P. 768–770.

13. Staessen C., Van Assche E., Joris H., Bonduelle M., Vandervorst M., Liebaers I., Van Steirteghem A. Clinical experience of sex determination by fluorescent in-situ hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Molecular Human Reproduction*. 1999. Vol. 5, No. 4. P. 382–389. DOI: 10.1093/molehr/5.4.382.

14. Laurie A. D., Hill A. M., Harraway J. R., Fellowes A. P., Phillipson G. T., Benny P. S., Smith M. P., George P. M. Preimplantation genetic diagnosis for hemophilia A using indirect linkage analysis and direct genotyping

approaches. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010. Vol. 8, No. 4. P. 783–789.

15. Treff N. R., Fedick A. M., Tao X., Devkota B., Taylor D., Scott R. T. Jr. Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. *Fertility and Sterility*. 2013. Vol. 99, No. 5. P. 1377–1384.

16. Palmerola K. P., Vitez S. F., Amrane S., Fischer C. P., Forman E. J. Minimizing mosaicism: assessing the impact of fertilization method on rate of mosaicism after next-generation sequencing (NGS) preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2019. Vol. 36, No. 1. P. 153–157.

17. Parikh F. R., Athalye A. S., Naik N. J., Naik D. J., Sanap R. R., Madon P. F. Preimplantation genetic testing: its evolution, where are we today? *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2018. Vol. 11, No. 4. P. 306–314.

18. Backenroth D., Zahdeh F., Kling Y., Peretz A., Rosen T., Kort D., Zeligson S., Dror T., Kirshberg S., Burak E., Sehel R., Levy-Lahad E., Zangen D., Altarescu G., Carmi S., Zeevi D. A. Haploseek: A 24-hour all-in-one method for preimplantation genetic diagnosis (PGD) of monogenic disease and aneuploidy. *Genetics in Medicine*. 2019. Vol. 21, No. 6. P. 1390–1399.

19. Harper J. C., Aittomaki K., Borry P., Cornel M. C., de Wert G., Dondorp W., Geraedts J., Gianaroli L., Ketterson K., Liebaers I., Lundin K., Mertes H., Morris M., Pennings G., Sermon K., Spits C., Soini S., van Montfoort A P A, Veiga A., Vermeesch J. R., Viville S., Macek Jr. M. Recent developments in genetics and medically assisted reproduction: from research to clinical applications. *European Journal of Human Genetics*. 2018. Vol. 26, No. 1. P. 12–33.

20. Kuliev A., Rechitsky S. Polar body-based preimplantation genetic diagnosis for Mendelian disorders. *Molecular Human Reproduction*. 2011. Vol. 17, No. 5. P. 275–285.

21. Liebaers I., Desmyttere S., Verpoest W., De Rycke M., Staessen C., Sermon K., Devroey P., Haentjens P., Bonduelle M. Report on a consecutive series of 581 children born after blastomere biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Human Reproduction*. 2010. Vol. 25, No. 1. P. 275–282.

22. Kuliev A., Pakhalchuk T., Verlinsky O., Rechitsky S. Preimplantation genetic diagnosis for hemoglobinopathies. *Hemoglobin*. 2011. Vol. 35, No. 5–6. P. 547–555.

23. Goossens V., Sermon K., Lissens W., Vandervorst M., Vanderfaeillie A., De Rijcke M., De Vos A., Henderix P., Van De Velde H., Van Steirteghem A., Liebaers I. Clinical application of preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis. *Prenatal Diagnosis*. 2000. Vol. 20, No. 7. P. 571–581.

24. Kuliev A. Practical Preimplantation Genetic Diagnosis. 2nd ed. London, UK : Springer, 2013. 304 pp. DOI: 10.1007/978-1-4471-4090-0.

25. Geraedts J., Montag M., Magli M. C., Repping S., Handyside A., Staessen C., Harper J., Schmutzler A., Collins J., Goossens V., van der Ven H., Vesela K., Gianaroli L. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: Clinical results. *Human Reproduction*. 2011. Vol. 26, No. 11. P. 3172–3180.

26. Fragouli E., Alfarawati S., Daphnis D. D., Goodall N-N., Mania A., Griffiths T., Gordon A., Wells D. Cytogenetic analysis of human blastocyst with the use of FISH, CGH, and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Human Reproduction*. 2011. Vol. 26, No. 2. P. 480–490.

27. Colls P., Escudero T., Fischer J., Cekleniak N. A., Ben-Ozer S., Meyer B., Damien M., Grifo J. A., Hershlag A., Munné S. Validation of array comparative genome hybridization for diagnosis of translocations in preimplantation human embryos. *Reproductive Biomedicine Online*. 2012. Vol. 24, No. 6. P. 621–629.

28. Yang Z., Liu J., Collins G. S., Salem S. A., Liu X., Lyle S. S., Peck A. C., Sills E. S., Salem R. D. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good

prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Molecular Cytogenetics*. 2012. Vol. 5, No. 1. P. 24. DOI: 10.1186/1755-8166-5-24.

29. The portal for rare diseases and orphan drugs. URL: <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php> (cited: 17.07.2020).

30. De Mouzon J., Goossens V., Bhattacharya S., Castilla J. A., Ferraretti A. P., Korsak V., Kupka M., Nygren K. G., Andersen A. N. Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*. 2012. Vol. 27, No. 4. P. 954–966.

31. Kuliev A., Rechitsky S., Verlinsky O. Atlas of preimplantation genetic diagnosis. 3rd ed. London : CRC Press, 2014. 328 pp. DOI: 10.1201/b16719.

32. Thornhill A. R., de Die-Smulders C. E., Geraedts J. P., Harper J. C., Harton G. L., Lavery S. A., Moutou C., Robinson M. D., Schmutzler A.G., Scriven P. N., Serman K. D., Wilton L., ESHRE PGD Consortium. ESHRE PGD Consortium ‘Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)’. *Human Reproduction*. 2005. Vol. 20, No. 1. P. 35–48.

33. ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group, Kokkali G., Coticchio G., Bronet F., Celebi C., Cimadomo D., Goossens V., Liss J., Nunes S., Sfontouris I., Vermeulen N., Zakharova E., De Rycke M. ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT. *Human Reproduction Open*. 2020. Vol. 2020, No. 3. P. hoaa020. DOI: 10.1093/hropen/hoaa020.

34. ESHRE PGT-M Working Group, Carvalho F., Moutou C., Dimitriadou E., Dreesen J., Giménez C., Goossens V., Kakourou G., Vermeulen N., Zuccarello D., De Rycke M. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders. *Human Reproduction Open*. 2020. Vol. 2020, No. 3. P. hoaa018. DOI: 10.1093/hropen/hoaa018.

35. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W. W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H. L.,

ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. 2015. Vol. 17, No. 5. P. 405–424.

36. Zegers-Hochschild F., Adamson G. D., Dyer S., Racowsky C., de Mouzon J., Sokol R., Rienzi L., Sunde A., Schmidt L., Cooke I. D., Simpson J. L., van der Poel S. The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Human Reproduction*. 2017. Vol. 32, No. 9. P. 1786–1801.

37. Bay B., Ingerslev H. J., Lemmen J. G., Degn B., Rasmussen I. A., Kesmodel U. S. Preimplantation genetic diagnosis: a national multicenter obstetric and neonatal follow-up study. *Fertility and Sterility*. 2016. Vol. 106, No. 6. P. 1363–1369.

38. He H., Jing S., Lu C. F., Tan Y. Q., Luo K. L., Zhang S. P., Gong F., Lu G. X., Lin G. Neonatal outcomes of live births after blastocyst biopsy in preimplantation genetic testing cycles: a follow-up of 1721 children. *Fertility and Sterility*. 2019. Vol. 112, No. 1. P. 82–88.

39. Winter C., Van Acker F., Bonduelle M., Desmyttere S., Nekkebroeck J. Psychosocial development of full term singletons, born after preimplantation genetic diagnosis (PGD) at preschool age and family functioning: A prospective case-controlled study and multi-informant approach. *Human Reproduction*. 2015. Vol. 30, No. 5. P. 1122–1136.

40. Sacks G. C., Altarescu G., Guedalia J., Varshaver I., Gilboa T., Levy-Lahad E., Eldar-Geva T. Developmental neuropsychological assessment of 4- to 5-year-old children born following Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD): A pilot study. *Child Neuropsychology*. 2016. Vol. 22, No. 4. P. 458–471.

41. Heijligers M., Van Montfoort A., Meijer-Hoogeveen M., Broekmans F., Bouman K., Homminga I., Dreesen J., Paulussen A., Engelen J., Coonen E., van der Schoot V., van Deursen-Luijten M., Muntjewerff N., Peeters A., van Golde R., van der Hoeven M., Arens Y., de Die-Smulders C. Perinatal follow-up of children born after preimplantation genetic diagnosis between 1995 and

2014. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2018. Vol. 35, No. 11. P. 1995–2002.

42. Shenfield F., Pennings G., Devroey P., Sureau C., Tarlatzis B., Cohen J., ESHRE Ethics Task Force. Taskforce 5: preimplantation genetic diagnosis. *Human Reproduction*. 2003. Vol. 18, No. 3. P. 649–651.

43. Fernández R. M., Peciña A., Lozano-Arana M. D., Sánchez B., Guardiola J., García-Lozano J. C., Borrego S., Antiñolo G. Experience of preimplantation genetic diagnosis with HLA matching at the university hospital Virgen del Rocio in Spain: technical and clinical overview. *BioMed Research International*. 2014. P. 560160. DOI: 10.1155/2014/560160.

44. Kahraman S., Beyazyurek C., Ekmekci C. G. Seven years of experience of preimplantation HLA typing: a clinical overview of 327 cycles. *Reproductive Biomedicine Online*. 2011. Vol. 23, No. 3. P. 363–371.

45. Devolder K. Preimplantation HLA typing: having children to save our loved ones. *Journal of Medical Ethics*. 2005. Vol. 31, No. 10. P. 582–586.

46. ESHRE PGT-A/SR Working Group, Coonen E., Llusa C. R., Christopikou D., Gontar J., Goossens V., Maurer M., Spinella F., Vermeulen N., De Rycke M. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations. *Human Reproduction Open*. 2020. Vol. 2020, No. 3. P. hoaa017. DOI: 10.1093/hropen/hoaa017.

47. Findikli N., Kahraman S., Saglam Y., Beyazyurek C., Sertyel S., Karlikaya G., Karagozoglu H., Aygun B. Embryo aneuploidy screening for repeated implantation failure and unexplained recurrent miscarriage. *Reproductive Biomedicine Online*. 2006. Vol. 13, No. 1. P. 38–46.

48. Coates A., Hesla J. S., Hurliman A., Coate B., Holmes L., Matthews R., Mounts E. L., Turner K. J., Thornhill A. R., Griffin D. K. Use of suboptimal sperm increases the risk of aneuploidy of the sex chromosomes in preimplantation blastocyst embryos. *Fertility and Sterility*. 2015. Vol. 104, No. 4. P. 866–872.

49. Kahraman S., Findikli N., Biricik A., Oncu N., Ogur C., Sertyel S., Karlikaya G., Karagozoglu H., Saglam Y. Preliminary FISH studies on spermatozoa and embryos in patients with variable degrees of teratozoospermia and a history of poor prognosis. *Reproductive BioMedicine Online*. 2006. Vol. 12, No. 6. P. 752–761.

50. The ESHRE Guideline Group on RPL, Atik R. B., Christiansen O. B., Elson J., Kolte A. M., Lewis S., Middeldorp S., Nelen W., Peramo B., Quenby S., Vermeulen N., Goddijn M. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction Open*. 2018. Vol. 2018, No. 2. P. hoy004. DOI: 10.1093/hropen/hoy004.

51. Coco R. Genetic counseling prior to Assisted Reproductive Technology procedures in the era of cytogenomics. *JBRA Assisted Reproduction*. 2018. Vol. 22, No. 4. P. 375–380.

52. Ginoza M. E. C., Isasi R. Regulating preimplantation genetic testing across the world: A comparison of international policy and ethical perspectives. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2020. Vol. 10, No. 5. P. a036681. DOI: 10.1101/cshperspect.a036681.

53. Deleye L., DeConinck D., Christodoulou C., Sante T., Dheedene A., Heindryckx B., Van den Abbeel E., De Sutter P., Menten B., Deforce D., Van Nieuwerburgh F. Whole genome amplification with SurePlex results in better copy number alteration detection using sequencing data compared to the MALBAC method. *Scientific Reports*. 2015. Vol. 5. P. 11711. DOI: 10.1038/srep11711.

54. Renwick P., Trussler J., Lashwood A., Braude P., Ogilvie C. M. Preimplantation genetic haplotyping: 127 diagnostic cycles demonstrating a robust, efficient alternative to direct mutation testing on single cells. *Reproductive Biomedicine Online*. 2010. Vol. 20, No. 4. P. 470–476.

55. La Framboise T. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Research*. 2009. Vol. 37, No. 13. P. 4181–4193.

56. Handyside A. H., Harton G. L., Mariani B., Thornhill A. R., Affara N., Shaw M.-A., Griffin D. K. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *Journal of Medical Genetics*. 2010. Vol. 47, No. 10. P. 651–658.

57. De Rycke M., Goossens V., Kokkali G., Meijer-Hoogeveen M., Coonen E., Moutou C. ESHRE PGD Consortium data collection XIV-XV: cycles from January 2011 to December 2012 with pregnancy follow-up to October 2013. *Human Reproduction*. 2017. Vol. 32, No. 10. P. 1974–1994.

58. Spits C., De Rycke M., Verpoest W., Lissens W., Van Steirteghem A., Liebaers I., Sermon K. Preimplantation genetic diagnosis for Marfan syndrome. *Fertility and Sterility*. 2006. Vol. 86, No. 2. P 310–320.

59. Treff N. R., Scott R. T. Jr. Four-hour quantitative real-time polymerase chain reaction-based comprehensive chromosome screening and accumulating evidence of accuracy, safety, predictive value, and clinical efficacy. *Fertility and Sterility*. 2013. Vol. 99, No. 4. P. 1049–1053.

60. Treff N. R., Tao X., Ferry K. M., Su J., Taylor D., Scott R. T. Jr. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening. *Fertility and Sterility*. 2012. Vol. 97, No. 4. P. 819–824.

61. Dahdouh E. M., Balayla J., Audibert F., Genetics Committee; Wilson R. D., Audibert F., Brock J.-A., Campagnolo C., Carroll J., Chong K., Gagnon A., Johnson J.-A., MacDonald W., Okun N., Pastuck M., Vallée-Pouliot K. Technical update: preimplantation genetic diagnosis and screening. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*. 2015. Vol. 37, No. 5. P. 451–463.

62. Griffin D. K., Wilton L. J., Handyside A. H., Atkinson G. H., Winston R. M., Delhanty J. D. Diagnosis of sex in preimplantation embryos by fluorescent in situ hybridisation. *British Medical Journal*. 1993. Vol. 306, No. 6889. P. 1382. DOI: 10.1136/bmj.306.6889.1382.

63. Munné S. Analysis of chromosome segregation during preimplantation genetic diagnosis in both male and female translocation heterozygotes. *Cytogenetic and Genome Research*. 2005. Vol. 111, No. 3–4. P. 305–309.

64. Schrurs B. M., Winston R. M. L., Handyside A. H. Preimplantation diagnosis of aneuploidy using fluorescent in situ hybridization: evaluation using a chromosome 18-specific probe. *Human Reproduction*. 1993. Vol. 8, No. 2. P. 296–301.

65. Munné S., Fragouli E., Colls P., Katz-Jaffe M., Schoolcraft W., Wells D. Improved detection of aneuploid blastocysts using a new 12-chromosome FISH test. *Reproductive BioMedicine Online*. 2010. Vol. 20, No. 1. P. 92–97.

66. Ioannou D., Meershoek E. J., Thornhill A. R., Ellis M., Griffin D. K. Multicolour interphase cytogenetics: 24 chromosome probes, 6 colours, 4 layers. *Molecular and Cellular Probes*. 2011. Vol. 25, No. 5–6. P. 199–205.

67. Turner K., Fowler K., Fonseka G., Griffin D., Ioannou D. Multicolor detection of every chromosome as a means of detecting mosaicism and nuclear organization in human embryonic nuclei. *Panminerva Medica*. 2016. Vol. 58, No. 2. P. 175–190.

68. Twisk M., Mastenbroek S., Hoek A., Heineman M.-J., van der Veen F., Bossuyt P. M., Repping S., Korevaar J. C. No beneficial effect of preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age with a high risk for embryonic aneuploidy. *Human Reproduction*. 2008. Vol. 23, No. 12. P. 2813–2817.

69. Liu W., Zhang H., Hu D., Lu S., Sun X. The performance of MALBAC and MDA methods in the identification of concurrent mutations and aneuploidy screening to diagnose beta-thalassaemia disorders at the single- and multiple-cell levels. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2018. Vol. 32, No. 2. P. e22267. DOI: 10.1002/jcla.22267.

70. Borgström E., Paterlini M., Mold J. E., Frisen J., Lundeberg J. Comparison of whole genome amplification techniques for human single cell

exome sequencing. *PLoS ONE*. 2017. Vol. 12, No. 2. P. e0171566. DOI: 10.1371/journal.pone.0171566.

71. Chen M., Song P., Zou D., Hu X., Zhao S., Gao S., Ling F. Comparison of multiple displacement amplification (MDA) and multiple annealing and looping-based amplification cycles (MALBAC) in single-cell sequencing. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, No. 12. P. e114520. DOI: 10.1371/journal.pone.0114520.

72. Coskun S., Alsmadi O. Whole genome amplification from a single cell: A new era for preimplantation genetic diagnosis. *Prenatal Diagnosis*. 2007. Vol. 27, No. 4. P. 297–302.

73. Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Human Reproduction Update*. 2005. Vol. 11, No. 1. P. 33–41.

74. Kirchhoff M., Gerdes T., Rose H., Maahr J., Ottesen A. M., Lundsteen C. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry*. 1998. Vol. 31, No. 3. P. 163–173.

75. Lichter P., Joos S., Bentz M., Lampel S. Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Seminars in Hematology*. 2000 Vol. 37, No. 4. P. 348–357.

76. Wells D., Escudero T., Levy B., Hirschhorn K., Delhanty J. D., Munné S. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertility and Sterility*. 2002. Vol. 78, No. 3. P. 543–549.

77. De Ravel T. J., Devriendt K., Fryns J. P., Vermeesch J. R. What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH). *European Journal of Pediatrics*. 2007. Vol. 166. P. 637–643.

78. Keltz M. D., Vega M., Sirota I., Lederman M., Moshier E. L., Gonzales E., Stein D. Preimplantation genetic screening (PGS) with comparative genomic hybridization (CGH) following day 3 single cell blastomere biopsy markedly improves IVF outcomes while lowering multiple pregnancies and

miscarriages. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2013. Vol. 30, No. 10. P. 1333–1339.

79. The use of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a committee opinion. *Fertility and Sterility*. 2018. Vol. 109, No. 3. P. 429–436. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.01.002.

80. Fishel S., Gordon A., Lynch C., Dowell K., Ndukwe G., Kelada E., Thornton S., Jenner L., Cater E., Brown A., Garcia-Bernardo J. Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy—the future of IVF? *Fertility and Sterility*. 2010. Vol. 93, No. 3. P. 1006.e7–1006.e10. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.09.055.

81. Johnson D. S., Gemelos G., Baner J., Ryan A., Cinnioglu C., Banjevic M., Ross R., Alper M., Barrett B., Frederick J., Potter D., Behr B., Rabinowitz M. Preclinical validation of a microarray method for full molecular karyotyping of blastomeres in a 24-h protocol. *Human Reproduction*. 2010. Vol. 25, No. 4. P. 1066–1075.

82. Vanneste E., Voet T., Melotte C., Debrock S., Sermon K., Staessen C., Liebaers I., Fryns J.-P., D’Hooghe T., Vermeesch J. R. What next for preimplantation genetic screening? High mitotic chromosome instability rate provides the biological basis for the low success rate. *Human Reproduction*. 2009. Vol. 24, No. 11. P. 2679–2682.

83. Del Rey J., Vidal F., Ramírez L., Borràs N., Corrales I., Garcia I., Martinez-Pasarell O., Fernandez S. F., Garcia-Cruz R., Pujol A., Plaja A., Salaverria I., Oliver-Bonet M., Navarro J. Novel Double Factor PGT strategy analyzing blastocyst stage embryos in a single NGS procedure. *PLoS ONE*. 2018. Vol. 13. P. e0205692. DOI: 10.1371/journal.pone.0205692.

84. García-Pascual C. M., Navarro-Sánchez L., Navarro R., Martínez L., Jiménez J., Rodrigo L., Simón C., Rubio C. Optimized NGS Approach for Detection of Aneuploidies and Mosaicism in PGT-A and Imbalances in PGT-SR. *Genes (Basel)*. 2020. Vol. 11, No. 7. P. 724. DOI: 10.3390/genes11070724.

85. Victor A. R., Griffin D. K., Brake A. J., Tyndall J. C., Murphy A. E., Lepkowsky L. T., Lal A., Zouves C. G., Barnes F. L., McCoy R. C., Viotti M. Assessment of aneuploidy concordance between clinical trophoctoderm biopsy and blastocyst. *Human Reproduction*. 2019. Vol. 1, No. 34(1). P. 181–192.

86. Hsin-Fu Chen, Ming Chen, Hong-Nerng Ho. An overview of the current and emerging platforms for preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) in *in vitro* fertilization programs. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2020. Vol. 59, No. 4. P. 489–495.

87. Sachdev N. M., McCulloh D. H., Kramer Y., Keefe D., Grifo J. A. The reproducibility of trophoctoderm biopsies in euploid, aneuploid, and mosaic embryos using independently verified next-generation sequencing (NGS): a pilot study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020. Vol. 37. P. 559–571.

88. Hreinsson J., Lundin K., Iwarsson E., Hausken J., Einarsson S., Grøndahl M. L., Hydén-Granskog C., Ingerslev H. J. Preimplantation genetic testing legislation and accessibility in the Nordic countries. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2020. Vol. 99, No. 6. P. 716–721.

89. Bayefsky M. J. Comparative preimplantation genetic diagnosis policy in Europe and the USA and its implications for reproductive tourism. *Reproductive Biomedicine & Society Online*. 2016. Vol. 3. P. 41–47.

90. Branum R., Wolf S. M. International policies on sharing genomic research results with relatives: approaches to balancing privacy with access. *The Journal of Law, Medicine & Ethics*. 2015. Vol. 43, No. 3. P. 576–593.

91. Weiner C. Anticipate and communicate: Ethical management of incidental and secondary findings in the clinical, research, and direct-to-consumer contexts (December 2013 report of the Presidential Commission for the Study of Bioethical Issues). *American Journal of Epidemiology*. 2014. Vol. 180, No. 6. P. 562–564.

92. Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Use of preimplantation genetic testing for monogenic defects (PGT-M) for adult-

onset conditions: an Ethics Committee opinion. *Fertility and Sterility*. 2018. Vol. 109, No. 6. P 989–992.

93. Committee on bioethics, committee on genetics, and, the American college of medical genetics and, genomics social, ethical and legal issues committee. Ethical and Policy Issues in Genetic Testing and Screening of Children. *Pediatrics March*. 2013. Vol. 131, No. 3. P. 620–622.

94. Чоговадзе А. Г. Особенности законодательного регулирования преимплантационной и пренатальной генетической диагностики в различных странах. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2012. Т. 7, № 2, С. 112–118.

95. Knoppers B. M., Bordet S., Isasi R. M. Preimplantation genetic diagnosis: an overview of socio-ethical and legal considerations. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2006. Vol. 7. P. 201–221.

96. Wilkinson S. Choosing tomorrow's children. The ethics of selective reproduction. Oxford, UK : Oxford University Press, 2012. 274 pp.

97. Soto-Lafontaine M., Dondorp W., Provoost V., de Wert G. Dealing with treatment and transfer requests: How PGD professionals discuss ethical challenges arising in everyday practice. *Medicine, Health Care & Philosophy*. 2008. Vol. 21, No. 3. P. 375–386.

98. Xu K., Montag M. New perspectives on embryo biopsy: Not how, but when and why? *Seminars in Reproductive Medicine*. 2012. Vol. 30, No. 4. P. 259–266.

99. Franklin S., Roberts C. Born and made: An ethnography of PGD. Princeton, NJ : Princeton University Press, 2006. 288 pp.

100. Наказ МОЗ України № 787 від 09.09.2013 Про затвердження Порядку застосування допоміжних репродуктивних технологій в Україні. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1697-13#Text> (cited: 15.11.2019).

101. Висновок до проекту Закону України від 23.04.2019 № 8629-1 Про Допоміжні репродуктивні технології. URL: <https://ips.ligazakon.net/document/ХН6NP1AQ?an = 75> (cited: 15.11.2019).

102. Chow J. F. C., Cheng H. H. Y., Lau E. Y. L., Yeung W. S. B., Ng E. H. Y. Distinguishing between carrier and noncarrier embryos with the use of long-read sequencing in preimplantation genetic testing for reciprocal translocations. *Genomics*. 2020. Vol. 112, No. 1. P. 494–500.

103. Kubicek D., Hornak M., Horak J., Navratil R., Tauwinklova G., Rubes J., Vesela K. Incidence and origin of meiotic whole and segmental chromosomal aneuploidies detected by karyomapping. *Reproductive Biomedicine Online*. 2019. Vol. 38, No. 3. P. 330–339.

104. Yan L., Huang L., Xu L., Huang J., Ma F., Zhu X., Tang Y., Liu M., Lian Y., Liu P., Li R., Lu S., Tang F., Qiao J., Xie X. S. Live births after simultaneous avoidance of monogenic diseases and chromosome abnormality by next-generation sequencing with linkage analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015. Vol. 112, No. 52. P. 15964–15969.

105. Chamayou S., Sicali M., Lombardo D., Alecci C., Ragolia C., Maglia E., Liprino A., Cardea C., Storaci G., Romano S., Guglielmino A. Universal strategy for preimplantation genetic testing for cystic fibrosis based on next generation sequencing. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020. Vol. 37. P. 213–222.

106. De Geyter C., Calhaz-Jorge C., Kupka M. S., Wyns C., Mocanu E., Motrenko T., Scaravelli G., Smeenk J., Vidakovic S., Goossens V., European IVF-monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). ART in Europe, 2014: results generated from European registries by ESHRE: The European IVF-monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Human Reproduction*. 2018. Vol. 33, No. 9. P. 1586–1601.

107. De Rycke M., De Vos A., Belva F., Berckmoes V., Bonduelle M., Buysse A., Keymolen K., Liebaers I., Nekkebroeck J., Verdyck P., Verpoest W. Preimplantation genetic testing with HLA matching: from counseling to birth and beyond. *Journal of Human Genetics*. 2020. Vol. 65, No. 5. P. 445–454.

108. Зерова-Любимова Т. Е., Горовенко Н. Г. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини : метод. реком. Київ, 2003. 24 с.
109. Howe B., Umrigar A., Tsien F. Chromosome preparation from cultured cells. *Journal of Visualized Experiments*. 2014. No. 83. P. 50203.
110. Зерова-Любимова Т. Е., Горовенко Н. Г. Стандарты анализа препаратов хромосом человека: метод. реком. Киев, 2003. С. 10, 16-18.
111. Ворсанова, С. Г., Юров Ю. Б., Чернышов В. Н. Хромосомные синдромы и аномалии. Классификация и номенклатура. Ростов-на-Дону : Молот, 1999. 192 с.
112. Ferrer-Vaquer A., Barragán M., Rodríguez A., Vassena R. Altered cytoplasmic maturation in rescued *in vitro* matured oocytes. *Human Reproduction*. 2019. Vol. 34, No. 6. P 1095–1105.
113. Bertero A., Ritrovato F., Evangelista F., Stabile V., Fortina R., Ricci A., Revelli A., Vincenti L., Nervo T. Evaluation of equine oocyte developmental competence using polarized light microscopy. *Reproduction*. 2017. Vol. 153, No. 6. P. 775–784.
114. Wallach E. E., Palermo G. D., Cohen J., Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: a powerful tool to overcome fertilization failure. *Fertility and Sterility*. 1996. Vol. 65, No. 5. P. 899–908.
115. Veeck L. L. The morphological assessment of human oocytes and early conception. *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility* / Ed. Keel B. A., Webster B. W. Boca Raton : CRC Press, 1990. P. 353–369.
116. Palermo G. D., Cohen J., Alikani M., Adler A., Rosenwaks Z. Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction, Fertility and Development*. 1995. Vol. 7, No. 2. P. 211–217.
117. Palermo G. D., Cohen J., Alikani M., Adler A., Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. *Fertility and Sterility*. 1995. Vol. 63, No. 6. P. 1231–1240.

118. Esteves S. C., Roque M., Bedoschi G., Haahr T., Humaidan P. Intracytoplasmic sperm injection for male infertility and consequences for offspring. *Nature Reviews Urology*. 2018. Vol. 15, No. 9. P. 535–562.
119. Rosenwaks Z., Pereira N. The pioneering of intracytoplasmic sperm injection: historical perspectives. *Reproduction*. 2017. Vol. 154, No. 6. P. F71–F77. DOI: 10.1530/REP-17-0308.
120. Lopes L. S., Esteves S. C. Testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in non-azoospermic men: A paradigm shift. *Panminerva Medica*. 2019. Vol. 61, No. 2. P. 178–186.
121. Rader K., Choi Y.-H., Hinrichs K. Intracytoplasmic sperm injection, embryo culture, and transfer of in vitro-produced blastocysts. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2016. Vol. 32, No. 3. P. 401–413.
122. Scott L., Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day after oocyte retrieval. *Human Reproduction*. 1998. Vol. 13, No. 4. P. 1003–1013.
123. Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*. 2003. Vol. 9, No. 3. P. 237–249.
124. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*. 2011. Vol. 26, No. 6. P. 1270–1283.
125. Schoolcraft W. B., Gardner D. K., Lane M., Schlenker T., Hamilton F., Meldrum D. R. Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. *Fertility and Sterility*. 1999. Vol. 72, No. 4. P. 604–609.
126. Gardner D. K., Lane M., Stevens J., Schenkel T., Schoolcraft W.B. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and sterility*. 2000. Vol. 73, No. 6. P. 1155–1158.

127. Gardner D. K., Balaban B. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and ‘OMICS’: is looking good still important? *Molecular Human Reproduction*. 2016. Vol. 22, No. 10. P. 704–718.

128. Lichter P., Ried T. Chapter 25. Molecular analysis of chromosome aberrations in situ hybridization. *Methods in molecular biology* / Ed. Walker J. M. Totowa, NJ : Humana Press, 2010. P. 449–478.

129. Ворсанова С. Г., Юров Ю. Б., Чернышов В. Н. Медицинская цитогенетика. Москва, 2006. С. 219–222.

130. Атраментова Л. О., Утєвська О. М. Статистичні методи в біології : підручник. Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2007. 288 с.

131. Гланц С. Медико-биологическая статистика : пер. с англ. Москва : Практика, 1998. 459 с.

132. ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009): Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature / Ed. Shaffer L. G., Slovak M. L., Campbell L. J. Basel : Karger Publishing, 2009. 138 pp.

133. Van Landuyt L., Polyzos N.P., De Munck N., Blockeel C., Van de Velde H., Verheyen G. A prospective randomized controlled trial investigating the effect of artificial shrinkage (collapse) on the implantation potential of vitrified blastocysts. *Human Reproduction*. 2015. Vol. 30, No. 11. P. 2509–2518.

134. Brouillet S., Martinez G., Coutton C., Hamamah S. Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review. *Reproductive Biomedicine Online*. 2020. Vol. 40, No. 6. P. 779–796.

135. Cimadomo D., Rienzi L., Capalbo A., Rubio C., Innocenti F., García-Pascual C. M., Ubaldi F. M., Handyside A. The dawn of the future: 30 years from the first biopsy of a human embryo. The detailed history of an ongoing revolution. *Human Reproduction Update*. 2020. Vol. 26, No. 4. P. 453–473.

136. Chamayou S., Sicali M., Alecci C., Ragolia C., Liprino A., Nibali D., Storaci G., Cardea A., Guglielmino A. The accumulation of vitrified oocytes is a strategy to increase the number of euploid available blastocysts for transfer after preimplantation genetic testing. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2017. Vol. 34, No. 4. P. 479–486.
137. Hu X., Ding C., Zhang D., Zhou W., Wang J., Zeng Y., Lv J., Xu Y., Zhou C.-Q. Embryo pooling: A promising strategy for managing insufficient number of embryos in preimplantation genetic diagnosis. *Gynecology Endocrinology*. 2017. Vol. 33, No. 11. P. 867–871.
138. Templeton A., Morris J. K. Reducing the risk of multiple births by transfer of two embryos after in vitro fertilization. *The New England Journal of Medicine*. 1998. Vol. 339, No. 9. P. 573–577.
139. Déniz F. P., Encinas C., Fuente J. L. Morphological embryo selection: an elective single embryo transfer proposal. *JBRA Assisted Reproduction*. 2018. Vol. 22, No. 1. P. 20–25.
140. Ubaldi F. M., Capalbo A., Colamaria S., Ferrero S., Maggiulli R., Vajta G., Sapienza F., Cimadomo D., Giuliani M., Gravotta E., Vaiarelli A., Rienzi L. Reduction of multiple pregnancies in the advanced maternal age population after implementation of an elective single embryo transfer policy coupled with enhanced embryo selection: pre- and post-intervention study. *Human Reproduction*. 2015. Vol. 30, No. 9. P. 2097–2106.
141. Gardner D., Meseguer M., Rubio C., Treff N. R. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Human Reproduction update*. 2015. Vol. 21, No. 6. P. 727–747.
142. Rubio I., Galan A., Larreategui Z., Ayerdi F., Bellver J., Herrero J., Meseguer M. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertility and Sterility*. 2014. Vol. 102, No. 2. P. 1287–1294.

143. Bendus A. E. B., Mayer J. F., Shipley S. K., Catherino W. H. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertility and Sterility*. 2006. Vol. 86, No. 6. P. 1608–1615.

144. Gianaroli L., Magli M. C., Ferraretti A. P., Lappi M., Borghi E., Ermini B. Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. *Human Reproduction*. 2007. Vol. 22, No. 1. P. 241–249.

145. Ilyin 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.

146. 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 доп. XV міжнар. наук. конф. студ., мол. вчених та фахівців, Харків, 25–26 квіт. 2018 р.* Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2018. С. 72–73.

147. 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 доп. XIV міжнар. наук. конф. студ., асп., докт., мол. вчених та фахівців, Харків, 30–31 бер. 2017 р.* Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2017. Т. 2. С. 71–74.

148. 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 доп. XVI міжнар. наук.-практ. конф., Харків, 28–29 бер. 2019 р.* Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2019. С. 74–75.

149. 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 доп. XV міжнар. наук. конф. студ., мол. вчених та фахівців, Харків, 25–26 квіт. 2018 р.* Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2018. С. 49–51.

150. 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 доп. XIV міжнар. наук. конф. студ., асп., докт., мол. вчених та фахівців, Харків, 30–31 бер. 2017 р.* Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2017. Т. 2. С. 74–76.

151. Mastenbroek S., Repping S. Preimplantation genetic screening: back to the future. *Human Reproduction*. 2014. Vol. 29, No. 9. P. 1846–1850.

152. Mertzaniidou A., Wilton L., Cheng J., Spits C., Vanneste E., Moreau Y., Vermeesch J. R., Sermon K. Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Human Reproduction*. 2013. Vol. 28, No. 1. P. 256–264.

153. Van Echten-Arends J., Mastenbroek S., Sikkema-Raddatz B., Korevaar J. C., Heineman M. J., Van Der Veen F., Repping S. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. *Human Reproduction Update*. 2011. Vol. 17, No. 5. P. 620–627.

154. Fragouli E., Alfarawati S., Spath K., Babariya D., Tarozzi N., Borini A., Wells D. Analysis of implantation and ongoing pregnancy rates following the transfer of mosaic diploid-aneuploid blastocysts. *Human Genetics*. 2017. Vol. 136, No. 7. P. 805–819.

155. Верлінський О. Ю., Гонтар Ю. В., Казачкова Н. І., Лахно Я. В., Ільїн І. Є., Федота О. М. Дослідження робертсонівських та реципрокних транслокацій людини у програмах допоміжних репродукційних технологій. *Актуальні питання сучасної медицини : тези доп. XVII міжнар. наук. конф.*

студ., мол. вчених та фахівців, присвяч. 215-річчю заснування мед. ф-ту Харків. нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна, Харків, 26–27 бер. 2020 р. Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2020. С. 59.

156. Fodina V., Dudorova A., Alksere B., Dzalbs A., Vedmedovska N., Andersone S., Una C., Juris E., Dace B. The application of PGT-A for carriers of balanced structural chromosomal rearrangements. *Gynecological Endocrinology*. 2019. Vol. 35, suppl. 1. P. 18–23.

157. Тавокина Л. В. Спектр хромосомных аномалий в кариотипах пациентов с репродуктивными проблемами. *Здоровье женщины*. 2013. № 10. С. 115–120.

158. Баранов В. С., Кузнецова Т. В. Цитогенетика эмбрионального развития человека: Научно-практические аспекты. Санкт-Петербург : Н-Л., 2007. 640 с.

159. Mateu-Brull E., Rodrigo L., Peinado V., Mercader A., Campos-Galindo I., Bronet F., García-Herrero S., Florensa M., Milán M., Rubio C. Interchromosomal effect in carriers of translocations and inversions assessed by preimplantation genetic testing for structural rearrangements (PGT-SR). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2019. Vol. 36, No. 12. P. 2547–2555.

160. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека : пер с англ. Москва : Мир, 1989. Т. 1. 312 с.

161. Paththinige C. S., Sirisena N. D., Kariyawasam U. G. I. U., Dissanayake V. H. W. The frequency and spectrum of chromosomal translocations in a cohort of Sri Lankans. *BioMed Research International*. 2019. Vol. 2019. P. 9797104. DOI: 10.1155/2019/9797104.

162. Morin S. J., Eccles J., Iturriaga A., Zimmerman R. S. Translocations, inversions and other chromosome rearrangements. *Fertility and Sterility*. 2017. Vol. 107, No. 1. P. 19–26.

163. Xie Y., Xu Y., Wang J., Miao B., Zeng Y., Ding C., Gao J., Zhou C. Preliminary analysis of numerical chromosome abnormalities in reciprocal and Robertsonian translocation preimplantation genetic diagnosis cases with

24-chromosomal analysis with an aCGH/SNP microarray. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2018. Vol. 35, No. 1. P. 177–186.

164. Gug C., Rațiu A., Navolan D., Drăgan I., Groza I.-M., Păpurică M., Vaida M.-A., Mozoș I., Jurcă M. C. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in miscarriage samples: A retrospective study of 330 cases. *Cytogenetic and Genome Research*. 2019. Vol. 158, No. 4. P. 171–183.

165. Dutta U. R., Swamy V., Ponnala R., Aggarwal S., Dalal A. Determining the cause of recurrent miscarriages in a couple: Importance of NOR in the era of NGS. *Journal of Reproduction & Infertility*. 2019. Vol. 20, No. 2. P. 109–114.

166. 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: 10.7124/feeo.v27.1325.

167. Beyer C. E., Willats E. Natural selection between day 3 and day 5/6 PGD embryos in couples with reciprocal or Robertsonian translocations. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2017. Vol. 34, No. 11. P. 1483–1492.

168. 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: 10.7124/visnyk.utgis.14.1.539.

169. Dul E., van Echten-Arends J., Groen H., Kastrop P., Wissen L. A., Engelen J., Land J., Coonen E., van Ravenswaaij-Arts C. Can characteristics of reciprocal translocations predict the chance of transferable embryos in PGD Cycles? *Journal of Clinical Medicine*. 2014. Vol. 3, No. 2. P. 348–358.

170. Bhérier C., Campbell C. L., Auton A. Refined genetic maps reveal sexual dimorphism in human meiotic recombination at multiple scales. *Nature Communications*. 2017. Vol. 8. P. 14994. DOI: 10.1038/ncomms14994.

171. Lenormand T., Engelstädter J., Johnston S. E., Wijnker E., Haag C. R. Evolutionary mysteries in meiosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2016. Vol. 371, No. 1706. P. 20160001.

172. Stevison L. S., Woerner A. E., Kidd J. M., Kelley J. L., Veeramah K. R., McManus K. F., Great Ape Genome Project, Bustamante C. D., Hammer M. F., Wall J. D. The time scale of recombination rate evolution in great apes. *Molecular Biology and Evolution*. 2016, Vol. 33, No. 4. P 928–945.

173. Brandvain Y., Coop G. Scrambling eggs: meiotic drive and the evolution of female recombination rates. *Genetics*. 2012. Vol. 190, No. 2. P. 709–723.

174. Baudat F., Buard J., Grey C., Fledel-Alon A., Ober C., Przeworski M., Coop G., de Massy B. PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science*. 2010. Vol. 327, No. 5967. P. 836–840.

175. Joseph S. B., Kirkpatrick M. Haploid selection in animals. *Trends in Ecology & Evolution*. 2004. Vol. 19, No. 11. P. 592–597.

176. Forabosco A., Percesepe A., Santucci S. Incidence of non-age-dependent chromosomal abnormalities: A population-based study on 88965 amniocenteses. *European Journal of Human Genetics*. 2009. Vol. 17, No. 7. P. 897–903.

177. Escudero T., Abdelhadi I., Sandalinas M., Munne S. Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertility and Sterility*. 2003. Vol. 79, suppl. 3. P. 1528–1534.

178. Пилип Л. Я. Особливості мейотичної сегрегації транслокацій у сперматозоїдах чоловіків із безпліддям : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.15. Київ, 2015. 22 с.

179. Munné S., Sandalinas M., Escudero T., Fung J., Gianaroli L., Cohen J. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertility and Sterility*. 2000. Vol. 73, No. 6. P. 1209–1218.

180. Ko D. S., Cho J. W., Park S. Y., Kim J. Y., Koong M. K., Song I. O., Kang I. S., Lim C. K. Clinical outcomes of preimplantation genetic diagnosis (PGD) and analysis of meiotic segregation modes in reciprocal translocation carriers. *American Journal of Medical Genetics*. 2010. Vol. 152A, No. 6. P. 1428–1433.

181. Rabinowitz M., Ryan A., Gemelos G., Hill M., Baner J., Cinnioglu C., Banjevic M., Potter D., Petrov D.A., Demko Z. Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres. *Fertility and Sterility*. 2012. Vol. 97. No. 2. P. 395–401.

182. Primerano A., Colao E., Vilella C., Nocera M. D., Ciambrone A., Luciano E., D'Antona L., Vismara M. F. M., Loddo S., Novelli A., Perrotti N., Malatesta P. A cryptic balanced translocation (5,17), a puzzle revealed through a critical evaluation of the pedigree and a FISH focused on candidate loci suggested by the phenotype. *Molecular Cytogenetics*. 2015. Vol. 8. P. 70. DOI: 10.1186/s13039-015-0172-1.

183. Smith A., Gaha T. J. Data on families of chromosome translocation carriers ascertained because of habitual spontaneous abortion. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 1990. Vol. 30, No. 1. P. 57–62.

184. Stapley J., Feulner P. G. D., Johnston S. E., Santure A. W., Smadja C. M. Variation in recombination frequency and distribution across eukaryotes: patterns and processes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2017. Vol. 372, No. 1736. P. 20160455. DOI: 10.1098/rstb.2016.0455.

185. Stefansson H., Helgason A., Thorleifsson G., Steinthorsdottir V., Masson G., Barnard J., Baker A., Jonasdottir A., Ingason A., Gudnadottir V. G., Desnica N., Hicks A., Gylfason A., Gudbjartsson D. F., Jonsdottir G. M., Sainz J., Agnarsson K., Birgisdottir B., Ghosh S., Olafsdottir A., Cazier J. B., Kristjansson K., Frigge M. L., Thorgeirsson T. E., Gulcher J. R., Kong A., Stefansson K. A common inversion under selection in Europeans. *Nature Genetics*. 2005. Vol. 37, No. 2. P. 129–137.

186. Campbell S. A., Uhlmann W. R., Duquette D., Johnson M. P., Evans M. I. Pregnancy outcome when both members of a couple have balanced translocations. *Obstetrics and Gynecology*. 1995. Vol. 85, No. 5, Pt. 2. P. 844–846.

187. Mamas T., Gordon A., Brown A., Harper J., Sengupta S. Detection of aneuploidy by array comparative genomic hybridization using cell lines to mimic a mosaic trophoctoderm biopsy. *Fertility and Sterility*. 2012. Vol. 97, No. 4. P. 943–947.

188. 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: 10.7124/feeo.v21.858.

189. 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 доп. XVII міжнар. наук. конф. студ., мол. вчених та фахівців, присвяч. 215-річчю заснування мед. ф-ту Харків. нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна, Харків, 26–27 бер. 2020 р.* Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2020. С. 58.

190. Aristidou C., Theodosiou A., Ketoni A., Bak M., Mehrjouy M. M., Tommerup N., Sismani C. Cryptic breakpoint identified by whole-genome mate-pair sequencing in a rare paternally inherited complex chromosomal rearrangement. *Molecular Cytogenetics*. 2018. Vol. 7, No. 34. 8 pp. DOI: 10.1186/s13039-018-0384-2.

191. Harton G. L., Magli M. C., Lundin K., Montag M., Lemmen J., Harper J. C. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group. Best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Human Reproduction*. 2010. Vol. 26, No. 1. P. 41–46.

192. Lupianez D. G., Kraft K., Heinrich V., Krawitz P., Brancati F., Klopocki E., Horn D., Kayserili H., Opitz J. M., Laxova R., Santos-Simarro F., Gilbert-Dussardier B., Wittler L., Borschiwer M., Haas S.A., Osterwalder M.,

Franke M., Timmermann B., Hecht J., Spielmann M., Visel A., Mundlos S. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*. 2015. Vol. 161, No. 5. P. 1012–1025.

193. Kentepozidou E., Aitken S. J., Feig C., Stefflova K., Ibarra-Soria X., Odom D. T., Roller M., Flicek P. Clustered CTCF binding is an evolutionary mechanism to maintain topologically associating domains. *Genome Biology*. 2020. Vol. 21. 5 pp. DOI: 10.1186/s13059-019-1894-x.

194. Maxwell S. M., Colls P., Hodes Wertz B., McCulloh D. H., McCaffrey C., Wells D., Munné S., Grifo J. A. Why do euploid embryos miscarry? A case-control study comparing the rate of aneuploidy within presumed euploid embryos that resulted in miscarriage or live birth using next-generation sequencing. *Fertility and Sterility*. 2016. Vol. 106, No. 6. P. 1414–1419.

195. Lai H. H., Chuang T. H., Wong L.-K., Lee M.-J., Hsieh C.-L., Wang H.-L., Chen S.-U. Identification of mosaic and segmental aneuploidies by next-generation sequencing in preimplantation genetic screening can improve clinical outcomes compared to array-comparative genomic hybridization. *Molecular Cytogenetics*. 2017. Vol. 10, No. 14. DOI: 10.1186/s13039-017-0315-7.

196. Dave B. J., Sanger W. G. Role of cytogenetics and molecular cytogenetics in the diagnosis of genetic imbalances. *Seminars in Pediatric Neurology*. 2007. Vol. 14, No. 1. P. 2–6.

197. Martin C. L., Warburton D. Detection of chromosomal aberrations in clinical practice: from karyotype to genome sequence. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2015. Vol. 16. P. 309–326.

198. Bono S., Biricik A., Spizzichino L., Nuccitelli A., Minasi M. G., Greco E., Spinella F., Fiorentino F. Validation of a semiconductor next-generation sequencing-based protocol for preimplantation genetic diagnosis of reciprocal translocations. *Prenatal Diagnosis*. 2015. Vol. 35, No. 10. P. 938–944.

199. Дмитрук І. М., Макух Г. В., Тиркус М. Я., Шуварська В. І., Маркевич Н. В., Лялюк О. В. Молекулярно-генетична діагностика мутацій

гена FGFR3 при ахондроплазії та гіпохондроплазії. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Т. 16. С. 197–200.

200. Макух Г. В. Мутації, що успадковуються як генетичний тягар: частота, фенотипові асоціації, діагностика : автореф. дис. ... д-ра біол. наук : 03.00.15. Київ, 2012. 39 с.

201. Dmytruk I. M., Makukh H. V., Turkys M. Y., Kitsera N. I. The polymorphisms of genes involved in DNA methylation in patients with malignancies from West Ukraine. *Biopolymers and Cell*. 2016. Vol. 32, No. 4. P. 279–288.

202. 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.

203. Верлинский О. Влияние кроссинговера на распределение генов бета-глобина между полярными тельцами и ооцитом и клинические испытания предимплантационной генетической диагностики с использованием анализа полярных телец. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: Біологія*. 2011. Вип. 14, № 971, С. 77–81.

204. 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. DOI: 10.1038/bmt.2017.46.

205. Burroughs L., Woolfrey A., Shimamura A. Shwachman-Diamond syndrome: A review of the clinical presentation, molecular pathogenesis,

diagnosis, and treatment. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2009. Vol. 23, No. 3. P. 233–248.

206. Hsu J. W., Vogelsang G., Jones R. J., Brodsky R. A. Bone marrow transplantation in Shwachman-Diamond syndrome. *Bone Marrow Transplantation*. 2002. Vol. 30, No. 4. P. 255–258.

207. Dror Y., Donadieu J., Koglmeyer J., Dodge J., Toiviainen-Salo S., Makitie O., Kerr E., Zeidler C., Shimamura A., Shah N., Cipolli M., Kuijpers T., Durie P., Rommens J., Siderius L., Liu J. M. Draft consensus guidelines for diagnosis and treatment of Shwachman-Diamond syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011. Vol. 1242. P. 40–55.

208. Cesaro S., Guariso G., Calore E., Gazzola M. V., Destro R., Varotto S., Zanesco L., Messina C. Successful unrelated bone marrow transplantation for Shwachman-Diamond syndrome. *Bone Marrow Transplantation*. 2001. Vol. 27. P. 97–99.

209. Cesaro S., Oneto R., Messina C., Gibson B. E., Buzyn A., Steward C., Gluckman E., Bredius R., Boogaerts M., Vermynen C., Veys P., Marsh J., Badell I., Michell G., Gungor T., Niethammer D., Bordigoni P., Oswald C., Favre C., Passweg J., Dini G., EBMT Severe Aplastic Anaemia and Paediatric Diseases Working Party. Haematopoietic stem cell transplantation for Shwachman-Diamond disease: a study from the European Group for blood and marrow transplantation. *British Journal of Haematology*. 2005. Vol. 131, No. 2. P. 231–236.

210. Pennings G. The decision making authority of patients and fertility specialists in Belgian law. *Reproductive Biomedicine Online*. 2007. Vol. 15, No. 1. P. 19–23.

211. Altarescu G., Brooks B., Kaplan Y., Eldar-Geva T., Margalioth E. J., Levy-Lahad E., Renbaum P. Single sperm analysis for haplotype construction of de-novo paternal mutations: application to PGD for neurofibromatosis type 1. *Human Reproduction*. 2006. Vol. 21, No. 8. P. 2047–2051.

212. Dhanjal S., Kakourou G., Mammas T., Saleh N., Doshi A., Gotts S., Nuttall S., Fordham K., Serhal P., Delhanty J., Harper J., SenGupta S. Preimplantation genetic diagnosis for retinoblastoma predisposition. *British Journal of Ophthalmology*. 2007. Vol. 91, No. 8. P. 1090–1091.

213. Altarescu G., Eldar-Geva T., Varshower I., Brooks B., Haran E. Z., Margalioth E. J., Levy-Lahad E., Renbaum P. Real-time reverse linkage using polar body analysis for preimplantation genetic diagnosis of female carriers of de-novo paternal mutations. *Human Reproduction*. 2009. Vol. 24, No. 12. P. 3225–3229.

214. 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: 10.1016/j.rbmo.2011.01.005.

215. Verlinsky Y., Kuliev. A. Practical Preimplantation Genetic Diagnosis. London, UK : Springer, 2005. 198 pp. DOI: 10.1007/1-84628-139-3.

216. Rechitsky S., Kuliev A. Novel indications for preimplantation genetic diagnosis. *Reproductive Biomedicine Online*. 2010. Vol. 20, suppl. : 10th International Congress on Preimplantation Genetic Disgnosis, Montpellier, France, 5–8 May 2010. P. S1–S2.

217. Goossens V., Harton G., Moutou C., Scriven P. N., Traeger-Synodinos J., Sermon K., Harper, J. C. ESHRE PGD Consortium data collection VIII: cycles from January to December 2005 with pregnancy follow-up to October 2006. *Human Reproduction*. 2008. Vol. 23, No. 12. P. 2629–2645.

218. Верлінський О. Ю., Гонтар Ю. В., Ільїн І. Є., Федота О. М. Біоетичні аспекти допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). *Біоетика та біобезпека: мультидисциплінарні аспекти : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків, 23–24 трав. 2017 р.* Харків, 2018. С. 40–41.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ

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: 10.7124/feeo.v27.1325. (Дисертант брав участь у розробці методології дослідження, інтерпретації результатів, підготовці статті до публікації).

2. Ilyin 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. DOI: 10.1038/bmt.2017.46. (Дисертант брав участь у проведенні досліджень, у 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: 10.7124/feeo.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: 10.7124/visnyk.utgis.14.1.539. (Дисертант брав участь у розробці методології дослідження, інтерпретації результатів, підготовці статті 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. (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 телец. *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: 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. 3rd ed. London : CRC Press, 2014. 328 pp. DOI: 10.1201/b16719.
(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 доп. XVII міжнар. наук. конф. студ., мол. вчених та фахівців, присвяч. 215-річчю заснування мед. ф-ту Харків. нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна, Харків, 26–27 бер. 2020 р.* Харків : ХНУ ім. 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 транслокацій людини у програмах допоміжних репродукційних технологій. *Актуальні питання сучасної медицини : тези доп. XVII міжнар. наук. конф. студ., мол. вчених та фахівців, присвяч. 215-річчю заснування мед. ф-ту Харків. нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна, Харків, 26–27 бер. 2020 р.* Харків : ХНУ ім. 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 доп. XVI міжнар. наук.-практ. конф., Харків, 28–29 бер. 2019 р.* Харків : ХНУ ім. 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 доп. XV міжнар. наук. конф. студ., мол. вчених та фахівців, Харків, 25–26 квіт. 2018 р.* Харків : ХНУ ім. 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 доп. XV міжнар. наук. конф. студ., мол. вчених та фахівців, Харків, 25–26 квіт. 2018 р.* Харків : ХНУ ім. 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 доп. XIV міжнар. наук. конф. студ., асп., докт., мол. вчених та фахівців, Харків, 30–31 бер. 2017 р.* Харків : ХНУ ім. 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 доп. XIV міжнар. наук. конф. студ., асп., докт., мол. вчених та фахівців, Харків, 30–31 бер. 2017 р.* Харків : ХНУ ім. 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 наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків, 23–24 трав. 2017 р.* Харків, 2018. С. 40–41.

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, заочна участь),

— науково-практичній конференції з міжнародною участю «Біоетика та біобезпека: мультидисциплінарні аспекти», присвяченій 105-річчю пам'яті В. К. Високовича (Харків, 2017, заочна участь),

— XII міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», присвяченої 50-річчю заснування УТГіС ім. М. І. Вавилова та 130-річчю від дня народження М. І. Вавилова (Умань, 2017, заочна участь),

— на XV, XVI, XVII та XVIII міжнародних наукових конференціях студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2018, 2019, заочна участь, 2020, 2021 секційна доповідь).

ДОДАТОК Б

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ



ТОВ „Медичний центр ІГР”

ЄДРПОУ 38441428

тел. (044) 450-36-07; тел. (044) 390-02-02; тел. (096) (095) (093) 220- 00-03

e-mail: receptionigr@gmail.com сайт: www.igr.com.ua

адреса: 03115, м.Київ, проспект Перемоги 121-Б



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ТОВ «Медичний центр ІГР»
Ільїн І.Є.

11 грудня 2020 року

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва запропонованого для впровадження:

Методики проведення діагностики генних та хромосомних порушень ранніх ембріонів, які асоційовані з порушенням розвитку ембріонів, їх імплантації та запобігання спонтанного переривання вагітності і народження дитини з патологіями в залежності від генетичних особливостей родини.

2. Ким запропоновано:

Верлінський Олег Юрійович

3. Де впроваджено:

ТОВ «Медичний центр ІГР», 03115, м.Київ, проспект Перемоги, 121Б, оф. 228

4. При проведенні яких робіт впроваджена пропозиція:

При медико-генетичному консультуванні з метою підтвердження діагнозу, виявлення носіїв мутантних генів та/або структурних хромосомних порушень і проведення передімплантаційного тестування, пренатальної діагностики для запобігання народження хворої на досліджувану патологію дитини в родині.

5. Ефективність впровадження:

Розроблено новий дизайн та специфічні підходи для передімплантаційного генетичного тестування на анеуплоїдії та моногенну патологію, а також покращено медико-генетичне консультування родин пацієнтів.

Відповідальні за впровадження:

Головний лікар МЦ ІГР

Парницька О.І.

Завідувач діагностичною лабораторією

Гонтар Ю.В.

11.12.2020р