

Огляд сучасних методів передімплантаційних генетичних досліджень ембріонів

Д.О. Микитенко, Л.Я. Пилип

Клініка репродуктивної медицини «Надія», м. Київ

У статті розглянуті основні засади передімплантаційних генетичних досліджень ембріонів. Придільена увага різним об'єктам та методам дослідження.

Ключові слова: передімплантаційні генетичні дослідження, ПЛР, FISH, порівняльна геномна гібридизація, секвенування, каріоматинг.

Природою закладено, що основний сенс кожної родини – мати здорових дітей. І це бажання значною мірою зростає після встановлення діагнозу «безпліддя» чи народження хворої дитини. У низці випадків допоміжні репродуктивні технології (ДРТ) є чи не єдиним шляхом досягнення дітонародження такими подружніми парами завдяки широкому арсеналу методів штучного запліднення та передімплантаційним генетичним дослідженням (ПГД) – комплексу заходів, спрямованих на дослідження генетичних структур статевих клітин чи клітин ембріона на етапі до імплантації останнього в порожнину матки. Сучасний розвиток генетичних технологій значно випереджає можливості їхнього практичного впровадження, оскільки медична наука ще не в змозі повноцінно інтерпретувати частину отриманої в результаті дослідження інформації. А стрімкий розвиток технічних та діагностичних можливостей супроводжується необхідністю значної частини фахівців у зазначеній галузі.

Мета дослідження: висвітлення основних сучасних підходів до проведення ПГД.

Основи ПГД були закладені ще у 1967 р., коли у науковій літературі з'явилось перше повідомлення щодо визначення статі ембріонів кролика на стадії бластоцисти [1]. Однак широкі клінічні дослідження та впровадження розроблень у клінічну практику були тривалий час утруднені відсутністю високочутливих та надійних молекулярних методів діагностики. І лише у 1990 р. народилась перша дитина у подружжя з X-зчепленою патологією в анамнезі після проведення визначення статі на передімплантаційному етапі [2]. Подальший розвиток діагностичних технологій сприяв широкому впровадженню методів ПГД та зробив їх невід'ємною частиною проведення циклів ДРТ. Пізніше, у 1997 р. з метою централізованого збору даних та стандартизації проведення передімплантаційних досліджень була сформована ініціативна група, яка в подальшому отримала назву PGD Consortium¹.

Показання до діагностики

Передімплантаційні генетичні дослідження умовно можна розділити на:

- передімплантаційну генетичну діагностику;
- передімплантаційний генетичний скринінг.

Між цими двома поняттями методична частина діагностики відрізняється несуттєво. Однак існує низка певних важливих відмінностей. Власне діагностику (у вузькому сенсі поняття) проводять у подружніх пар, що є носіями встановленого генного чи хромосомного дефекту. А використання скринінгового підходу зумовлене тим, що навіть у фертильних подружніх пар частка ембріонів із анеуплоїдіями у повному або мозаїчному стані досягає 50% [3] (залежно від кількості досліджених хромосом). І, хоча більшість з генетично аномальних ембріонів не імплантується або припиняє розвиток на ранніх термінах вагітності, ризик народження дитини з хромосомними аномаліями все ж існує. Тому, зважаючи на зусилля, витрачені пацієнтами та лікарями на досягнення вагітності у програмах ДРТ, доцільно мінімізувати ризик переносу анеуплоїдного ембріона. Саме тому передімплантаційний генетичний скринінг проводять за умов, коли подружня пара не має встановлених порушень генетичного апарату, однак імовірність отримання ембріона з генетичним дефектом є підвищеною.

Підсумувавши, можна ввести показання до проведення ПГД у перелік, наведений у табл. 1.

Етичні питання та аналіз нормативно-правової бази застосування ПГД були нами попередньо висвітлені [4], то ж наразі зосередимо увагу на суто медичних аспектах.

ПГД є етапною процедурою, що включає у себе:

- 1) біопсію матеріалу для дослідження;
- 2) пробопідготовку;
- 3) власне дослідження.

На сьогодні існують три різні підходи до аналізу генетичного матеріалу на передімплантаційному етапі: аналіз полярних тілець яйцеклітини, бластомера ембріону та клітин трофобластичної оболонки, порівняння яких надане у табл. 2.

¹PGD Consortium – структурний підрозділ European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), в завдання якого входять збір, аналіз результатів передімплантаційних досліджень в циклах ДРТ, а також уніфікація досліджень шляхом формулювання рекомендацій, правил та протоколів.

Таблиця 1

Показання до проведення ПГД ембріонів

Передімплантаційний генетичний скринінг	Передімплантаційна генетична діагностика
<ul style="list-style-type: none"> • Звичне невиношування вагітності • Множинні невдалі спроби ДРТ (перенос 3 і більше ембріонів якості не нижче за 3ВВ за Гарднером або більше 10 ембріонів незалежно від кількості переносів) • Безпліддя невизначеного ґенезу • Вік матері понад 35 років • Виразений чоловічий фактор безпліддя (підвищений рівень анеуплоїдії сперматозоїдів) • Наявність в анамнезі вагітності чи народження дитини з хромосомною аномалією 	<ul style="list-style-type: none"> • Підтверджене носійство структурних хромосомних перебудов • Підтверджене носійство мутацій генів, що зумовлюють спадкову генну патологію • HLA-селекція ембріонів

Порівняльна характеристика об'єктів ПГД

Об'єкт дослідження	Опис	Переваги	Обмеження
Полярні тільця (перше та друге)	Редукційні клітинні тільця, що формуються на різних стадіях дозрівання ооцита у ході I та II поділів мейозу	Полярні тільця не відіграють ролі у заплідненні та можуть бути вилучені з мінімальним ризиком пошкодження ооцита; – можливість проведення дослідження до етапу запліднення; – проведення дослідження на матеріалі неембріонального походження, що є етично та релігійно прийнятно та законно у деяких країнах	Дослідження дає побічне уявлення про генетичний апарат ооцита і не є гарантією відсутності генетичної патології у ембріона; – аналіз не враховує чоловічий фактор запліднення та відповідно не є характеристикою майбутнього ембріона; – аналіз не виключає мітотичні хромосомні аномалії; – проведення дослідження на даному етапі є більш працемістким та високовартісним
Бластомери	Клітини ембріона на 3-ю добу розвитку (6-8-клітинна стадія). Клітини є недиференційованими та можуть бути вилучені у кількості одна-дві з умовно незначним впливом на життєздатність ембріона	Дослідження бластомерів дає безпосереднє уявлення про стан генетичного апарату аналізованої клітини; – можливість виявляти чоловічий фактор та мітотичні анеуплоїдії, що виникли на ранніх етапах розвитку ембріона	Біопсія бластомера знижує життєздатність та імплантаційний потенціал ембріонів на 34–39%; – дослідження не виключає мозаїцизму ембріона; – не виключена можливість подальшої самокорекції ембріонів із анеуплоїдіями
Клітини трофекто-дермальної оболонки	Клітини ембріонального походження, що складають зовнішню оболонку на стадії бластоцисти (5–6-а доба)	Відсутність негативного впливу біопсії на життєздатність ембріона; – більша кількість отриманих клітин сприяє точності результату та зниженню ймовірності явища "випадіння аелеля"; – тестування дає безпосереднє уявлення про стан генетичного апарату ембріона; – урахується можливість мозаїцизму; – більша частина ембріонів з хромосомними аномаліями не розвиваються до стадії бластоцисти (природний добір), що зумовлює економічну перевагу дослідження трофектодерми; – наявність часу для модифікації ендометрія (за необхідності); – сприяння селективному переносу одного ембріона (eSET) та зниженню частоти багатоплідних вагітностей	Дослідження трофектодерми вимагає можливості ембріологічної лабораторії вести бластоцистну культуру; – ембріони досягають стадії бластоцисти у різний часовий проміжок, що призводить до значних часових витрат на проведення дослідження; – ДРТ-цикли з ПГД, за якими через технічні особливості результат не може бути отриманий протягом доби, вимагають кріоконсервування / вітрифікації ембріонів з наступним використанням у програмах після розморожування

Примітки: * – Складено з використанням даних [5-16].

Із даних, наведених у табл. 2, випливає, що вибір будь-якого об'єкта для ПГД пов'язаний із певними обмеженнями, які обов'язково мають бути взяті до уваги. Відтак, вибір має враховувати:

- особливості правового простору діяльності клініки;
- можливості ембріологічної лабораторії;
- предмет ПГД (на що саме проводять діагностику);
- діагностичний метод, який буде застосовано;
- віддаленість та технічна оснащеність цитогенетичної / молекулярно-діагностичної лабораторії;
- індивідуальні особливості ДРТ-циклу.

Особливості правового простору функціонування клініки ДРТ є, мабуть, найвагомішим чинником, під який підводяться усі інші. Законодавчі обмеження, що базуються, в першу чергу, на усталених релігійних поглядах в окремому регіоні, здатні суттєво обмежити свободу прийняття рішення як пацієнтами, так і лікарями, а також доступність даного виду медичної допомоги.

Біопсія полярних тілець (I та II) дозволяє отримати непрямі свідчення про генетичний апарат ооцита. Із огляду на те,

що більшість анеуплоїдій має материнське походження (до 80–90%) [17], із певної точки зору, дослідження полярних тілець є цілком логічним. Проведення такого аналізу передбачає оцінку I та II полярних тілець разом, оскільки за свідченням дослідників [18, 19], хромосомні чи хроматидні порушення, що виникли при I поділі мейозу, можуть компенсуватись під час II поділу з утворенням еуплоїдного ооцита. Однак прогнозований за полярними тільцями каріотип ооцита може бути хибним у 6% випадків [19]. Хромосомні аномалії I поділу мейозу виявляють приблизно у 31% випадків, аномалії II поділу мейозу після порушень I поділу – у 29%, ізольовані хромосомні аномалії II поділу – у 40% [18]. Використання чіп-порівняльної геномної гібридизації для досліджень на полярних тільцях дозволяє досягнути 30% вагітностей на ембріотрансфер (17% на початий цикл) у цільовій групі пацієнток віком понад 35 років [19]. Даний вид діагностики проводять переважно серед етнічних груп, в яких процедура передімплантаційних досліджень обмежена моментом запліднення. У таких випадках може досліджуватись лише I полярне тільце. Хоча, II полярне тільце може бути проаналізоване до моменту злиття батьківських пронукле-

усів, що потребує кріоконсервації ооцита на пронуклеарній стадії. За наявності технічних можливостей отримання результату протягом 9 год після біопсії, кріоконсервації піддаються ооцити з хромосомною/генною аномалією. Оскільки вважається, що зигота утворюється при злитті пронуклеусів, а аномальні ооцити не розморожуються чи не культивуються з утворенням генетично аномальних ембріонів, такий підхід є прийнятним у випадку законодавчих чи релігійних обмежень. А. Кулієв пропонує виокремити діагностику полярних тілець в окремий клас преємбріональних досліджень [18].

Біопсію бластомера проводять при досягненні ембріоном 6–8-клітинної стадії – 3-я доба розвитку (72 год після аспірації фолікулів). Зазвичай вилучається одна клітина. Однак біопсія навіть однієї клітини на 34–39% знижує імплантаційний потенціал ембріона [20] і на 10% – частоту настання вагітності [21]. При застосуванні чіп-порівняльної геномної гібридизації в передімплантаційних дослідженнях бластомерів вдається досягнути до 69,23% вагітностей на ембріотрансфер (проти 43,9% без проведення ПГД), знизити частоту багатоплідних вагітностей із 34,38% до 8,33% при використанні тактики селективного переносу одного ембріона (eSET) та знизити частоту невиношування вагітності з 26,06% до 11,11% [22].

Біопсію трофектодермальної оболонки проводять на стадії бластоцисти (5–6-а доба розвитку). Аналіз клітин трофектодерми із застосуванням чіп-порівняльної геномної гібридизації дозволяє отримати клінічну ефективність 70,9% вагітностей на ембріотрансфер та практично уникнути багатоплідних вагітностей [23]. Серед переваг трофектодермальної біопсії велике значення має можливість виключення мозаїцизму, щоправда, необхідно відзначити низьку ймовірність розходження хромосомного набору внутрішньої клітинної маси та клітин трофектодерми, що спостерігається у 5,8% випадків та стосується в основному анеуплоїдних ембріонів [24]. Робота з бластоцистами вимагає можливості ведення ембріологічною лабораторією бластоцистної культури і за відсутності технічної можливості виконання дослідження протягом доби, проведення вітрифікації з подальшим переносом ембріонів у кріоциклах.

Зрозуміло, що клінічна ефективність застосування методів передімплантаційної діагностики не є прямим свідченням результативності використання конкретного методу, а

слугує інтегральним показником ефективності роботи усіх залучених підрозділів, включаючи клінічне відділення ДРТ, ембріологічну та молекулярно-цитогенетичну лабораторії. Тож, якість роботи кожного учасника лікувально-діагностичного процесу та взаємодія між ними є вагомим модифікатором отриманих клінічних результатів.

Методи передімплантаційних генетичних досліджень

Хромосомні аномалії ембріонів є одним з основних факторів порушення імплантації. Повторна відсутність імплантації, як форма непліддя, може бути зумовлена комплексом причин, основними серед яких є генетичні, анатомічні та гормональні. Ембріональний фактор є ключовим, оскільки він на 70% визначає ймовірність імплантації [23].

Так, за даними дослідників [25], залежно від вибірки, частка анеуплоїдних ембріонів може варіювати в межах 40,5–60%. За опублікованими раніше власними даними Клініки репродуктивної медицини «Надія» при повногеномному передімплантаційному скринінгу ембріонів пацієнтів з множинними невдалими спробами ДРТ частка анеуплоїдних ембріонів становила 48,99% [26]. Як правило, анеуплоїдії ембріонів мають материнське походження (до 80–90%) [17, 27, 28], рідше – батьківське (до 10–20%) і ще на порядок рідше – мітотичної природи, що виникають через нерозходження хромосом у процесі дроблення зиготи. Це свідчить про необхідність всебічного обстеження подружньої пари з безпліддям та звертання значної уваги на фактори ризику зі сторони матері. Окрім того, одним із ключових факторів, що найсильніше корелює з частотою розвитку патології плода, є тривалість періоду безпліддя, що непрямо чинно додатково підкреслює генетичну обтяженість осіб із безпліддям, виділяючи їх в окрему групу ризику [29].

Відомо, що до 60% ооцитів мають хромосомні аномалії [30], і даний показник залежить від віку жінки, стрімко зростаючи після 35 років. Запліднення таких яйцеклітин може призвести до хромосомних аномалій у ембріонах. Переважна більшість хромосомних аномалій є бласто- та ембріопатіями, які спричиняють відсутність імплантації або мимовільні викидні на ранніх термінах вагітності.

Викладене вище підтверджує, що передімплантаційний ге-

Таблиця 3

Особливості застосування окремих методів з метою ПГД ембріонів

Методи	Приклади	Показання
<i>Методи обмеженого хромосомного скринінгу</i>		
Засновані на явищі ампліфікації (ПЛР-діагностика)	<ul style="list-style-type: none"> Класична ПЛР ПЛР в режимі реального часу Секвенування Фрагментарний аналіз Мінісеквенування/мас-спектрометрія 	<ul style="list-style-type: none"> Діагностика моногенної патології Селекція ембріона за HLA-генотипом Визначення резус-фактора ембріона Обмежений хромосомний скринінг
FISH-методи	<ul style="list-style-type: none"> FISH-аналіз 	<ul style="list-style-type: none"> Обмежений хромосомний скринінг Збалансовані хромосомні перебудови у батьків Певні випадки незбалансованих хромосомних перебудов Визначення статі ембріона
<i>Методи повногеномного скринінгу</i>		
Чіп-діагностика	<ul style="list-style-type: none"> Чіп-порівняльна геномна гібридизація SNP-чіпи 	<ul style="list-style-type: none"> Скринінг усього геному Хромосомні перебудови у батьків Чисельні невдалі спроби ДРТ Звичне невиношування вагітності при нормальному каріотипі плода
Секвенування "нового" покоління	<ul style="list-style-type: none"> Секвенування "нового" покоління Каріомапінг 	<ul style="list-style-type: none"> Скринінг усього геному Хромосомні перебудови у батьків Багаторазові невдалі спроби ДРТ Звичне невиношування вагітності при нормальному каріотипі плода Діагностика моногенної патології

нетичний скринінг на предмет хромосомних аномалій є дієвим механізмом підвищення результативності ДРТ-циклів.

Сучасні можливості молекулярної діагностики зумовили використання високочутливих методів ПГД, в основу яких покладене явище гібридизації нуклеїнових кислот. Їх можна розділити:

- за глибиною дослідження на:
 - методи обмеженого скринінгу (FISH, полімеразна ланцюгова реакція – ПЛР);
 - методи повногеномного скринінгу (чіп-діагностика, секвенування «нового» покоління, каріомапінг);
- за принципом діагностики на: методи, засновані на явищі ампліфікації (ПЛР-методи), флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH), та чіп-діагностика, включно з секвенуванням «нового» покоління.

Особливості їхнього використання для діагностики генетичної патології у ембріонів наведені в табл. 3.

Кожен із наведених методів заснований на детекції унікальних послідовностей ДНК, однак низка методичних особливостей зумовлює певні переваги застосування кожного з них у конкретному випадку.

Передімплантаційні генетичні дослідження із застосуванням методу ПЛР.

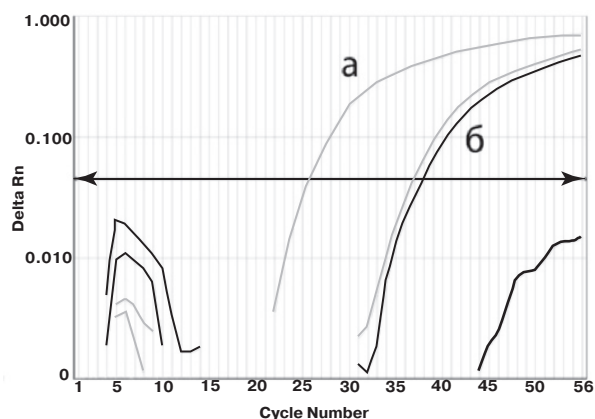
Методи ПЛР мають широкі діагностичні можливості, однак їхню головною особливістю є детекція коротких унікальних послідовностей ДНК, з чим і пов'язані обмеження їхнього використання – переважно з метою діагностики носійства генної патології.

Серед діагностичних можливостей варто виокремити такі:

- пряма діагностика генних мутацій;
- непряма діагностика генних мутацій;
- HLA- та резус-селекція ембріонів;
- скринінг анеуплоїдій (обмежений).

Зрозуміло, що робота з обмеженою кількістю генетичного матеріалу зумовлює два основні моменти: можливість дослідження невеликої кількості цільових послідовностей з однієї клітини та висока ймовірність діагностичної помилки через явище «випадіння алеля» (~25% для однієї клітини). Із метою виключення останнього під час діагностики конкретної мутації вводиться дослідження зчеплених із нею маркерів, що за свою суттю є поліморфізмами одиничних нуклеотидів (SNP) чи короткими тандемними повторами (STR). Використання кожного окремого зчепленого маркера знижує ймовірність помилки на 25% від попередньої. Із метою вибору зчеплених маркерів доцільно фокусувати увагу саме на високополіморфних їх варіантах, що розташовані на відстані не більший за 1–5 см (до 5% ймовірності рекомбінації), оптимально – до 2,5 см. За можливості варто уникати динуклеотидних STR-повторів через більшу ймовірність помилки ДНК-полімерази під час синтезу нуклеотидного ланцюга та обмежену розділну здатність QF-ПЛР. Із наведеного стає зрозумілою доцільність оцінювання діагностичної інформативності для кожного окремого випадку та наявності значної бібліотеки праймерів. В умовах необхідності дослідження кількох локусів одночасно вдаються до стратегії «гніздової» ПЛР (з метою попередньої ампліфікації цільових регіонів) або повногеномної ампліфікації. Підвищенню інформативності діагностики та зниженню ймовірності «випадіння алеля» сприяє також робота з клітинами трофобластичної оболонки, оскільки під час біопсії вдається отримати фрагмент, що складається, як правило, з понад 5 клітин.

На відміну від алгоритму, що використовують для таргетної діагностики мутації, скринінг анеуплоїдій та HLA-типизація ембріонів проводять з використанням кількох STR-локусів на досліджувану хромосому. Однак зрозуміло, що в таких випадках діагностика збалансованих хромосомних перебудов та мікрodelецій є неможливою.

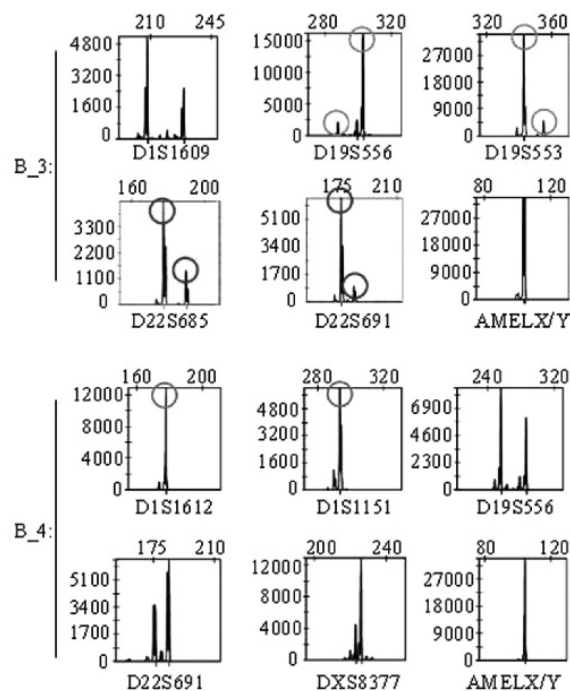


Мал. 1. Фрагмент передімплантаційної генетичної діагностики методом ПЛР в режимі «реального часу» з приводу полікістозу нирок: а – ембріон, що не є носієм генетичного дефекту; б – ембріон – носій домінуючої мутації с.9564_9566delCAA (р.N3188Kfs) гена PKD1 у гетерозиготному стані [4]

Візуалізація результатів реакції може відбуватися шляхом гел-електрофорезу, флуоресцентної детекції за кінцевою точкою чи в режимі «реального часу» (мал. 1), секвенування, мінісеквенування, капілярного електрофорезу (мал. 2).

Підсумовуючи наведене, можна формалізувати такі недоліки використання ПЛР у передімплантаційних дослідженнях:

- аналіз обмеженої кількості локусів;
- висока ймовірність контамінації;
- можливість неефективної ампліфікації;
- явище переважної ампліфікації та «випадіння алеля»;
- неможливість детекції мікрodelецій, збалансованих хромосомних перебудов, поліплоїдії;



Мал. 2. Приклад передімплантаційної діагностики ембріона з трисомією хромосом 19 та 22, а також ембріона з моносомією хромосоми 1 [31] із застосуванням методу ПЛР та капілярного електрофорезу (QF-ПЛР)

– необхідність попереднього оцінювання діагностичної інформативності подружньої пари;

– необхідність наявності широкої бібліотеки праймерів.

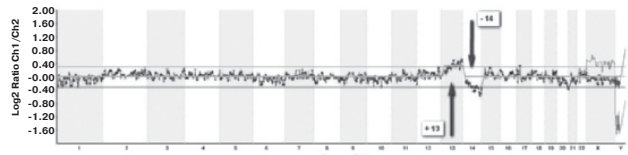
Новим кроком у розвитку передімплантаційного ПЛР-дослідження стала модифікація, що забезпечує можливість проведення умовно повногеномного скринінгу, в основі якого лежить явище кількісної ПЛР [32]. Працюючи з трофктодермою, авторам вдалося нівелювати явище «випадіння алеля» та забезпечити точність діагностики на рівні 98,6%. Однак проведення реакції потребує виконання кількісної ПЛР в режимі «реального часу» за 96 локусами в 4 повторах, що вимагає постановки одного 384-лунокового планшета на ембріон і значно обмежує пропускну здатність лабораторії, не вирішуючи проблему виключення мікрodelеційних синдромів.

Відповідно до звітів PGD Consortium, за 1997–2008 рр. асоційованими членами було проведено 4763 циклів із використанням ПЛР-діагностики, що складає близько 18% усіх передімплантаційних досліджень. Серед них 4578 – власне передімплантаційна діагностика, в той час як лише 182 – визначення статі ембріонів та 3 – обмежений передімплантаційний хромосомний скринінг [33].

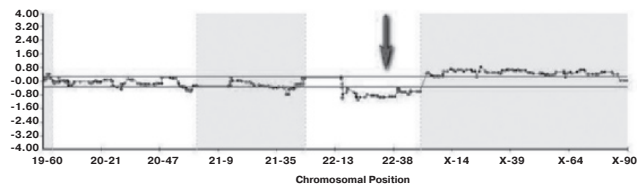
Світові тенденції використання ПЛР у передімплантаційній діагностиці характеризуються поступовим зростанням частки досліджень, проведених даним методом, які станом на 2008 р. становили 25,3% передімплантаційних досліджень [33–37]. Однак наразі ПЛР-метод, за виключенням діагностики моногенної патології, витісняється методами повногеномного скринінгу.

Флуоресцентна гібридизація *in situ*

FISH-метод знайшов широке застосування для проведення ПГД, враховуючи носіїв збалансованих структурних хромосомних перебудов. Зокрема, станом на кінець 2008 р. членами PGD Consortium було проведено 21 829 ДРТ циклів із застосуванням методу FISH для діагностики хромосомних аномалій [33], що становило близько 82% випадків передімплантаційних досліджень. Результати рандомізованих досліджень доводять клінічну ефективність проведення ПГД методом FISH у групах пацієнтів із невиношуванням [38–41], тяжким чоловічим фактором безпліддя [42] та серед жінок віком понад 35 років [43, 44] за рахунок підвищення частоти настання вагітності та зниження ризику мимовільних викиднів після програм ДРТ із ПГД. Однак існує низка досліджень, у яких клінічну ефективність методу FISH у ПГД виявлено не було [45–49]. Незважаючи на певні методичні обмеження даних робіт (наприклад, некоректний підбір груп контролю [46, 48], згубний вплив біопсії двох бластомерів на життєздатність ембріонів [45, 50], висока частка ембріонів без діагностики [51]), відсутність зростання частоти імплантації після ПГД можна пояснити діагностичними обмеженнями методу FISH, які унеможливають проведення повнохромосомного скринінгу. Застосування п'яти кольорів видимого спектра для мічення гібридизаційних зондів обмежує кількість локусів хромосом, копійність яких можна визначати одночасно, до п'яти. Аналіз додаткових локусів (а наявність або відсутність певного локусу екстраполюється на наявність або відсутність цілої хромосоми) вимагає проведення додаткових раундів гібридизації, з кожним з яких зростає ймовірність помилки. Тому за ідеальних умов теоретично можливо провести щонайбільше 3 раунди гібридизації із дослідженням 15 хромосом. Для проведення ПГД методом FISH застосовують суміш зондів на певні локуси тих хромосом, анеуплоїдію яких найчастіше реєструють у ембріонах на 3-ю добу розвитку (хромосоми 15, 16, 21, 22) та тих хромосом, немозаїчні анеуплоїдії яких найчастіше сумісні із живонародженням (хромосоми 13, 18, 21, X, Y) [52]. Обмежена кількість хромосом призводить до обмеженої діагностичної цінності методу FISH для ПГД. За



а – діаграма ПГД-ПГГ у подружньої пари, де жінка – носій транслокації 46,XX,t(6;13)(q27;q12). Клітини трофктодерми ембріона (5-а доба). Анеуплоїдний ембріон з трисомією хромосоми 13 та моносомією хромосоми 14 (46,XX,+13,-14), не залученої до діагностованої хромосомної перебудови матері



б – ПГД у подружньої пари, де чоловік – носій транслокації 45,XY,der(5)t(5;15)(q35;q11),-15. Ембріон жіночої статі зі збалансованим варіантом сегрегації батьківської транслокації та частковою моносомією за довгим плечем хромосоми 22 (агг CGH 22q11.1-q.13.33 x 1), що включає в себе комплекс симптомів CATCH 22 (Синдром Ді-Джорджі, Шпрингценна (VELO-кардіофасціальний)), і не залученої до діагностованої хромосомної перебудови батька

Мал. 3. Передімплантаційні генетичні дослідження методом ПГГ [57]

даними Munne та колег, дослідження 5 хромосом дозволяє виявляти 28–31% анеуплоїдій передімплантаційних ембріонів, 9 хромосом (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, Y) – 70–72% анеуплоїдій, 12 хромосом (+8, 14, 20) – 79–80% анеуплоїдій [53]. Сучасні дослідження, проведені методом порівняльної геномної гібридизації показали, що дослідження 12 хромосом дозволяє виявляти лише 68% хромосомних аномалій передімплантаційних ембріонів [52] (досягаючи, за нашими власними даними, точності діагностики до 74,8–78,3% [26]), – і лише за умови, що FISH-діагностику проводять з ідеальною точністю. Однак, на жаль, методу FISH бракує точності та відтворюваності для роботи на одній клітині. По-перше, для правильного проведення FISH-діагностики необхідною є оптимальна підготовка матеріалу – правильна фіксація ядра зі збереженням доступності хроматину для гібридизації та мінімізацією ризику накладання сигналів, що вимагає високого рівня технічних навичок спеціалістів [54]. По-друге, жодні проби (ні комерційні, ні приготувані у лабораторії) не дозволяють досягнути гібридизаційної ефективності у 100%, що свідчить про ризик отримання артефактних моносомій через відсутність гібридизації. Порушення гібридизації можуть також спостерігати при неправильному приготуванні матеріалу: наприклад, при порушенні денатурації гібридизаційного сайту. По-третє, аналіз результатів гібридизації залишається досить суб'єктивним та вимагає певних навичок. Зокрема, іноді можна спостерігати накладання сигналів, розташування їх у різних площинах, свідчення сміття, що нагадує сигнали, або розщеплення сигналу на два домени з ускладненням інтерпретації результатів. У таких випадках проводять додатковий раунд гібридизації із зондами до локусів тих самих хромосом, але інших районів.

Використання такого підходу дозволяє суттєво підвищити точність діагностики [53].

За даними PGD Consortium, із 12 620 програм ПГД, проведених із використанням методу FISH, зареєстровано 12 випадків помилкових діагнозів (0,1%), причиною яких можуть бути як мозаїцизм передімплантаційних ембріонів, так

і технічні обмеження методу FISH [55]. Тому після проведення ПГД у випадку настання вагітності пацієнтам рекомендують проведення інвазивної пренатальної діагностики для верифікації нормального каріотипу плода.

Таким чином, проведення ПГД методом FISH з суворим дотриманням рекомендацій PGD Consortium з контролю якості [56] дозволяє досліджувати анеуплоїдії окремих хромосом у передімплантаційних ембріонах, однак не дає повного уявлення про їхній каріотип.

Порівняльна геномна гібридизація

Новою сходинкою розвитку передімплантаційної діагностики стала імплементація у практику наукових доробок щодо чіп-діагностики, зокрема, порівняльної геномної гібридизації (ПГГ). Метод дозволяє проводити одномоментний скринінг усього геному на предмет анеуплоїдій, а також надавати кількісну характеристику окремих ділянок хромосом [57] (мал. 3). Зазначене сприяло розширенню діагностичних можливостей, підвищенню точності заключень та швидкому впровадженню методу у клінічну практику ДРТ-клінік. На сьогодні ПГГ є найуживанішим методом серед великих ПГД-лабораторій. Окремі дані щодо результативності методу вже представлені у міжнародній науковій літературі [24, 58–61].

Серед переваг методу доцільно виділити такі:

- висока роздільна здатність (від 1 млн п.н.);
- скринінг усіх хромосом на предмет незбалансованих перебудов, включаючи мікрodelеційні та дуплікаційні аномалії;
- об'єктивізація процесу аналізу результатів.

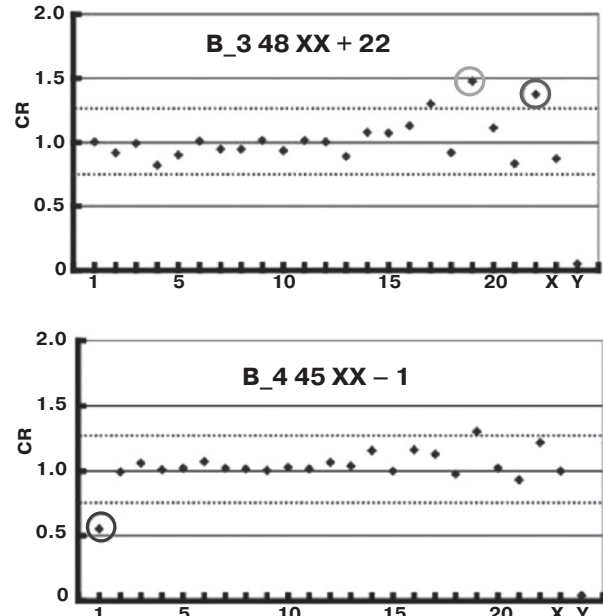
Серед обмежень доцільно виокремити:

- чутливість до якості вихідного матеріалу;
- неможливість детекції збалансованих хромосомних перебудов;
- обмежена можливість детекції мозаїцизму та поліплоїдії.

Процес дослідження є стадійним і включає в себе біопсію зразка, повногеномну ампліфікацію, мічення, гібридизацію на мікрочіпах, відмивку та сканування з наступним обробленням та інтерпретацією результатів. Дослідженням перекирається близько 25% усього геному, що забезпечує точну діагностику та достатню чутливість для виявлення мікрodelеційних дуплікаційних аномалій.

Основними критеріями для ідентифікації незбалансованих хромосомних аномалій є відхилення сегмента від ізоїнії профайла на величину $3xSD$ або $\pm 0,3 \log_2$ -ratio [61]. Хоча фактична величина зміщення сегмента може відрізнитися від теоретичної і задається зміщенням сегмента X-хромосоми при використанні перехресних за статтю референтних ДНК-контролів.

Передімплантаційні генетичні дослідження можна проводити на будь-якому ембріологічному матеріалі (полярних тільцях, бластомерах чи клітинах трофектодерми). Однак різний матеріал у цьому випадку матиме певні особливості інтерпретації результатів. Так, у випадку преембріональних досліджень передбачається проведення аналізу одночасно першого та другого полярних тілець через можливість компенсації аномалій I поділу мейозу аномаліями II поділу (так звані реципрокні анеуплоїдії в полярних тільцях). Додатково при аналізі полярних тілець є можливість за величиною зміщення сегмента диференціювати незбалансовані хроматидні та хромосомні аномалії. При дослідженні зміщень сегментів на діаграмі ПГГ бластомерів необхідно пам'ятати, що ембріон на 3-ю добу свого розвитку може бути мозаїчним, однак сам бластомер (як одна клітина) не є мозаїчним. Таким чином, незначні відхилення сегментів діаграми за окремими хромосомами можуть бути розцінені як артефакти з причини неефективної повногеномної ампліфікації чи деградації ДНК самого зразка. Інтерпретація результатів аналізу клітин трофектодерми є дещо складнішою процедурою, оскільки зразок біоптату містить 3–15 клітин. Тому, можуть зустрічатися випадки мозаїцизму, що характеризу-



Мал. 4. Приклад передімплантаційної діагностики ембріона з трисомією хромосом 19 та 22, а також ембріона з моносомією хромосоми 1 [31] із застосуванням методу секвенування «нового» покоління

ватимуться меншим зсувом сегмента діаграми за відповідною хромосомою (фрагментом хромосоми) від ізоїнії при зіставленні з відхиленням сегмента за статевими хромосомами. У випадку чистого профайла існує діагностична можливість фіксувати мозаїцизм $\geq 50\%$. Попри наявність публікацій відносно можливості детекції низькорівневого мозаїцизму методом чіп-ПГГ [62], робота з ембріональним матеріалом має низку описаних вище особливостей, що призводять до зниження чутливості методу. Метод не є чутливим для мозаїцизму нижче 25%, а в межах 25–50% – виникають складнощі з диференціюванням власне мозаїцизму та «хвиль», зумовлених деградацією ДНК чи порушеннями ампліфікації [63].

Поліплоїдія може бути запідозрена лише у ембріонів чоловічої статі при депресії сегмента X-хромосоми у порівнянні з контрольним зразком. Однак, оскільки лише 1,8% поліплоїдних ембріонів не несуть інших хромосомних аномалій [24], 98,2% із них будуть вибраковані шляхом ПГГ з причини наявності анеуплоїдії.

SNP-чіпи

Метод є різновидом високороздільного чіп-аналізу, що заснований на диференціюванні алельних варіантів поліморфізмів поодиноких нуклеотидів (SNP) і забезпечує проведення повногеномного скринінгу на предмет анеуплоїдій, однобатьківських дисомій та мікрodelеційних/дуплікаційних хромосомних аномалій. Максимально інформативним метод є за умови наявності зразків ДНК обох батьків, що слугують внутрішніми контролями (мал. 5). Метод є вкрай чутливим до якості вихідного матеріалу, забезпечує надзвичайно високу деталізацію результатів діагностики. Це може зумовлювати труднощі інтерпретації, зокрема у випадку необхідності диференціювання аномалій, що виникла внаслідок порушень повногеномної ампліфікації та мікрodelеційних/дуплікаційних аномалій, особливо при їх виникненні *de novo* у регіонах з остаточно невстановленою клінічною значущістю.

Секвенування «нового» покоління

Секвенування «нового» покоління зарекомендувало себе як найпотужніший метод повногеномного скринінгу. Однак

через молодість методу та його дороговизну він наразі поступається за поширеністю порівняльній геномній гібридизації.

Перевагами методу є повногеномний скринінг та можливість діагностики моногенної патології в ембріонах. Однак, як і іншим методам, йому притаманні певні обмеження, що пов'язані з:

- обмеженою можливістю детекції збалансованих хромосомних перебудов;
- обмеженою здатністю детекції мікроделецій, поліплоїдії, мозаїцизму;
- високою чутливістю до якості вихідного матеріалу;
- неоднорідністю ампліфікації фрагментів при використанні технологій ампліфікації всього геному;
- зниженням щільності покриття через підвищений CG-контент ДНК та наявність тандемних повторів;
- надто високою деталізацією, яка призводить до неможливості інтерпретації окремих порушень.

Сутність діагностики полягає у проведенні повногеномної ампліфікації зразка, із подальшим секвенуванням та розподілом «рідів» за окремими хромосомами. Оскільки відносна кількість зчитувань є порівняно стабільною для кожної індивідуальної хромосоми, зсув показника свідчатиме про анеуплоїдію (мал. 4).

Секвенування «нового» покоління є високовартісним методом дослідження, тож економічно вигідним він є при одночасному аналізі ~ 100 ембріонів. Із одного боку, такий великий діагностичний потік є неможливим у більшості лабораторій, що зумовлено термінами проведення аналізу та потужностями ДРТ-клінік, з якими вони співпрацюють, з іншого – збільшення кількості досліджуваних ембріонів за один запуск роботи приладу пов'язаний зі зниженням роздільної здатності аналізу. У таких випадках кількість зчитувань з ембріона становить близько 150 тис., що є меншим за однократне перекриття геному (1,25–5%). Це різко обмежує можливості діагностики генної патології, мікроделеційних порушень та встановлення збалансованих хромосомних аномалій. Точна діагностика моногенної патології передбачає принаймні 20-кратне перекриття досліджуваного регіону. А таке перекриття не є економічно вигідним. Тож, секвенування «нового» покоління є потужним і перспективним методом передімплантаційної діагностики анеуплоїдії, однак у відношенні моногенної патології даний підхід на сьогодні є недосконалим.

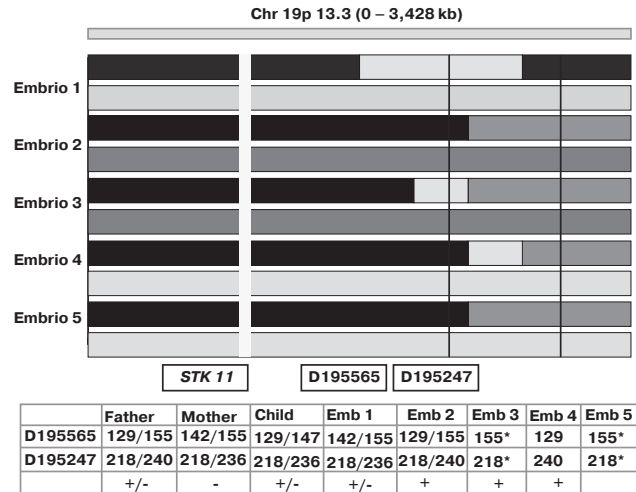
Каріомапінг

Даний вид досліджень є успішною адаптацією секвенування «нового» покоління до проведення саме ПГД. Основою методу є дослідження великої кількості поліморфізмів поодиноких нуклеотидів (від 300 тис.) в розрізі всього геному на основі кількісного чіп-аналізу, що дозволяє проводити діагностику анеуплоїдій, мікроделецій та непряму діагностику успадкування мутацій моногенних захворювань. Відправною точкою дослідження стає визначення батьківської карти SNP, визначення інформативних маркерів та аналіз генотипу ембріона з урахуванням явища рекомбінації хромосом (мал. 7).

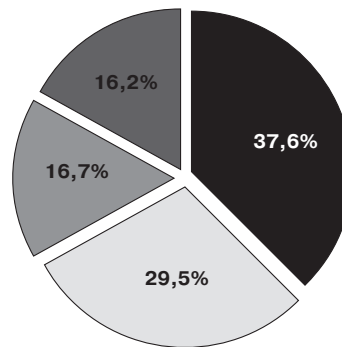
Перевагами методу є універсальність (не вимагає попереднього встановлення інформативності подружньої пари), висока точність та чутливість, що притаманно усім видам кількісних чіп-аналізів. Серед недоліків слід виокремити: високу чутливість до якості вихідного матеріалу, неможливість детекції збалансованих хромосомних аномалій, обмежену здатність до діагностики низькорівневого мозаїцизму та необхідність достеменного підтвердження діагнозу та його генетичної форми у випадку непрямої діагностики ембріона на предмет моногенної патології.

Переваги та недоліки кожного з методів наведені в табл. 4.

На тлі зазначеного вище виглядає доцільним скерування



Мал. 5. Приклад передімплантаційної діагностики з використанням методу каріомапінгу [65]



- Нормальний/збалансований хромосомний набір
- Хромосомні аномалії, асоційовані з батьківською перебудовою
- Хромосомні аномалії, не пов'язані з батьківською перебудовою
- Хромосомні аномалії, асоційовані з транс локацією, з залученням других хромосом

Мал. 6. Розподіл ембріонів від носіїв в структурних хромосомних перебудов (наведено за [66])

до проведення передімплантаційного дослідження парам – носіям хромосомних перебудов методом порівняльної геномної гібридизації, оскільки він дозволяє скринувати одночасно весь геном на предмет незбалансованих хромосомних аберацій. Зазначений факт є надзвичайно важливим, адже носії хромосомних перебудов заздалегідь мають підвищений рівень хромосомної нестабільності, що зумовлює зростання частоти виникнення анеуплоїдій ембріонів за хромосомами, що не залучені до батьківської хромосомної перебудови. Так, за даними [59] щодо пацієнтів – носіїв збалансованих структурних хромосомних перебудов, сумарно у 56,2% ембріонів були встановлені аномалії хромосом, не пов'язані з батьківською перебудовою, а, за нашими власними даними, – сумарно 62,2% (мал. 7) [66].

ВИСНОВКИ

Передімплантаційна генетична діагностика на сьогодні є єдиним способом виявлення генетичної патології ембріона, а відтак, і дієвим методом первинної профілактики народження дітей із генетично зумовленою патологією. Використання такого підходу дозволяє підвищити результативність циклів

Порівняльна характеристика методів передімплантаційної діагностики

Методи	Переваги	Технічні обмеження
Методи, засновані на явищі ампліфікації (ПЛР-діагностика)	• Детекція унікальних послідовностей ДНК	• Можливість "випадіння алеля" • Обмеження діагностики певним регіоном • Обмеженість детекції анеуплоїдій, поліплоїдій • Використання технологій ампліфікації всього геному вносить додаткові помилки
FISH-методи	• Детекція унікальних послідовностей ДНК	• Обмежена кількість флуорохромів • Неможливість детекції внутрішньохромосомних дефектів в межах одного кольорового бенду чи в немічених ділянках • Накладання сигналів • Розщеплення сигналів • Низька ефективність гібридизації • Порушення процесу фіксації клітин • Необхідність використання індивідуальних зондів (у носіїв хромосомних перебудов)
Геномна гібридизація	• Детекція унікальних послідовностей ДНК (кількісна) • Скринінг усього геному	• Роздільна здатність від 0,7 млн. пар основ. • Неможливість детекції збалансованих хромосомних перебудов. • Обмежена здатність детекції поліплоїдії, мозаїцизму. • Висока чутливість до якості вихідного матеріалу. • Неоднорідність ампліфікації фрагментів при використанні технологій ампліфікації всього геному. • Зниження величини встановлених відхилень (= достовірності порушень).
SNP-реї	• Детекція унікальних послідовностей ДНК (кількісна) • Скринінг усього геному	• Роздільна здатність від 0,5 тис. пар нуклеотидів • Обмежена здатність детекції мозаїцизму • Висока чутливість до якості вихідного матеріалу • Неоднорідність ампліфікації фрагментів при використанні технологій ампліфікації всього геному • Зниження величини встановлених відхилень (= достовірності порушень) • Надто висока деталізація призводить до неможливості інтерпретації окремих порушень
Секвенування "нового" покоління	• Детекція унікальних послідовностей ДНК (кількісна) • Скринінг усього геному • Можливість використання для діагностики точкових мутацій	• Обмеження можливості детекції збалансованих хромосомних перебудов • Обмежена здатність детекції поліплоїдії, мозаїцизму • Висока чутливість до якості вихідного матеріалу • Неоднорідність ампліфікації фрагментів при використанні технологій ампліфікації всього геному • Зниження щільності покриття через підвищений CG-контент ДНК та наявність тандемних повторів • Надто висока деталізація призводить до неможливості інтерпретації окремих порушень
Каріомапінг	• Детекція унікальних послідовностей ДНК (кількісна) • Скринінг усього геному Непряма діагностика моногенної патології	• Обмеження можливості детекції збалансованих хромосомних перебудов • Обмежена здатність детекції поліплоїдії, мозаїцизму • Висока чутливість до якості вихідного матеріалу • Неоднорідність ампліфікації фрагментів при використанні технологій ампліфікації всього геному • Необхідність достеменного підтвердження діагнозу та його генетичної форми

ДРТ, знизити рівень репродуктивних втрат під час вагітності та ймовірність народження дитини з порушеннями генетичного апарату. Особливості її застосування в окремих країнах пов'язані зі встановленими рамками конкретного соціального простору, щодо доцільності якого можуть дискутувати лише його громадяни. Україна, володіючи технічним обладнанням і технологіями світового рівня та не будучи поки обмеженою законодавчим регулюванням, має низку переваг щодо подальшого розвитку ПГД. Використавши таку перевагу, вона має усі шанси стати потужним центром «репродуктивного туризму».

Обзор современных методов предимплантационных генетических исследований эмбрионов Д.А. Микитенко, Л.Я. Пилип

В статье рассмотрены основные положения предимплантационных генетических исследований эмбрионов. Уделено внимание различным объектам и методам исследований.

Ключевые слова: предимплантационные генетические исследования, ПЦР, FISH, сравнительная геномная гибридизация, секвенирование, картирование.

Разом із тим, кожен метод, що використовується з цією метою, має свої показання. Надання переваги котромусь із них призводить до поляризації діагностичної технології та обмеження доступності медичної допомоги подружнім парам, що її потребують, зокрема, носіям моногенної патології, збалансованих хромосомних перебудов чи при нез'ясованих причинах безпліддя.

Ширше впровадження методів ПГД в клінічну практику сприятиме зменшенню рівня безпліддя та зниженню ризику народження дітей із генетичними аномаліями.

Modern methods of preimplantation genetic testing of embryos: a review D.O. Mykytenko, L.Ya. Pylyp

Fundamental bases of the preimplantation genetic testing of embryos were described. Special attention was paid to the various objects and methods of investigation.

Key words: preimplantation genetic testing, PCR, FISH, comparative genomic hybridization, sequencing, karyomapping.

Сведения об авторах

Микитенко Дмитрий Александрович – Клиника репродуктивной медицины «Надия», 03037, г. Киев, ул. Максима Кривоноса, 19-а; тел.: (044) 592-21-78. E-mail: d.mykytenko@genetics.kiev.ua

Пилип Лариса Ярославовна – Клиника репродуктивной медицины «Надия», 03037, г. Киев, ул. Максима Кривоноса, 19-а; тел.: (044) 537-75-97.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Edwards R.G. Sexing of live rabbit blastocysts / R.G. Edwards, R.L. Gardner // *Nature*. – 1967. – Vol. 214. – P. 567–577.
- Handyside A.H. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification / A.H. Handyside, E.H. Kontogianni, K. Hardy, R.M.L. Winston // *Nature*. – 1990. – Vol. 344. – P. 768–770.
- Delhanty J.D. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients / J.D. Delhanty, J.C. Harper, A.Ao et al. // *Hum Genet*. – 1997. – Vol. 99, N 6. – P. 755–760.
- Микитенко Д.О. Нова парадигма доімплантаційної генетичної діагностики / Д.О. Микитенко, В.Д. Зукін, О.В. Підгорна // *Здоровье женщины. Научно-практический журнал*. – 2011. – № 8 (64). – С. 24–32.
- Sex selection: options for regulation. A report on the HFEA's 2002-03 review of sex selection including a discussion of legislative and regulatory options. – Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA): London, 2003. – 42 p.
- Ray P.F. The place of 'social sexing' in medicine and science / P.F. Ray, A. Munnich, I. Nisand et al. // *Hum Reprod*. – 2002. – Vol. 17, N 1. – P. 248–249.
- Shakespeare T. Ethics watch: sex selection / T. Shakespeare // *Nat Genet Rev*. – 2005. – Vol. 6. – P. 666.
- Malpani A. Preimplantation sex selection for family balancing in India / A. Malpani, D. Modi // *Hum Reprod*. – 2002. – Vol. 17, N 1. – P. 11–12.
- American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Ethics and Committee on Genetics. ACOG Committee Opinion No. 410: ethical issues in genetic testing // *Obstet Gynecol*. – 2008. – Vol. 111. – P. 1495–1502.
- FIGO Committee for the Study of Ethical Aspects of Human Reproduction and Women's Health. Ethical issues in obstetrics and gynecology [Электронный ресурс]. – FIGOHouse: London, 2009. – 376 p. – Режим доступа: <http://www.figo.org/files/figo-corp/Ethical%20Issues%20-%20English.pdf>
- Thornhill A.R. ESHRE PGD Consortium: Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS) / A.R. Thornhill, C.E. deDie-Smulders, J.P. Geraedts [et al.] // *Hum Reprod*. – 2005. – Vol. 20. – P. 35–48.
- Terada Y. Different embryonic development after blastomere biopsy for preimplantation genetic diagnosis, observed by time-lapse imaging / Y. Terada, T. Ugajin, H. Hasegawa et al. // *Fertility and Sterility*. – 2009. – Vol. 92, N 4. – P. 1470–1471.
- Ugajin T. Aberrant behavior of mouse embryo development after blastomere biopsy as observed through time-lapse cinematography / T. Ugajin, Y. Terada, H. Hasegawa et al. // *Fertility and Sterility*. – 2010. – Vol. 93, N 8. – P. 2723–2728.
- Cho Y.J. Does blastomere biopsy in preimplantation genetic diagnosis affect early serum β -hCG levels? / Y.J. Cho, J.Y. Kim, I.O. Song et al. // *Clin Exp Reprod Med*. – 2011. – Vol. 38, N 1. – P. 31–36.
- Barbash-Hazan S. Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential / S. Barbash-Hazan, T. Frumkin, M. Malcov et al. // *Fertility and Sterility*. – 2009. – Vol. 92, N 3. – P. 890–896.
- Munné S. Self-correction of chromosomally abnormal embryos in culture and implications for stem cell production / S. Munné, E. Velilla, P. Colls et al. // *Fertil Steril*. – 2005. – Vol. 84, N 5. – P. 1328–1334.
- Simpson J.L. Preimplantation genetic diagnosis to improve pregnancy outcomes in subfertility / J.L. Simpson // *Beast Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. – 2012. – Vol. 26. – P. 805–815.
- Kuliev A. Practical Preimplantation Genetic Diagnosis. Second Ed. / A. Kuliev. – London: Springer, 2012. – 304 [P. 15] p.
- Geraedts J. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results / J. Geraedts, M. Montag, M.C. Magli [et al.] // *Hum Reprod*. – 2011. – Vol. 26, N 11. – P. 3173–3180.
- Treff N. Cleavage stage embryo biopsy significantly impairs embryonic reproductive potential while blastocyst biopsy does not: a novel paired analysis of cotransferred biopsied and non-biopsied sibling embryos / N. Treff, K.M. Ferry, T. Zhao [et al.] // 67th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, 2011. – O–4.
- Simpson J.L. Preimplantation genetic diagnosis to improve pregnancy outcomes in subfertility / J.L. Simpson // *Beast Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. – 2012. – Vol. 26. – P. 805–815.
- Keltz M.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 / M.D. Keltz, M. Vega, M. Lederman [et al.] // *J Assist Reprod Genet*. – 2013. – Vol. 30, N 10. – P. 1333–1339.
- Yang Z. 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 / Z. Yang, J. Liu, G.S. Collins [et al.] // *Molecular Cytogenetics*. – 2012. – Vol. 5. – P. 24.
- Gutiérrez-Mateo C. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos / C. Gutiérrez-Mateo, P. Colls, J. Sánchez-García [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2011. – Vol. 95, N 3. – P. 953–958.
- Comparison of the aneuploidy frequency in embryos derived from testicular sperm extraction in obstructive and non-obstructive azoospermic men / P. Platteau, C. Staessen, A. Michiels [et al.] // *Hum Reprod*. – 2004. – Vol. 19, N 7. – P. 1570–1574.
- Микитенко Д. Сравнительный анализ хромосомных аномалий у преимплантационных эмбрионов человека и спонтанных абортусов / Д.А. Микитенко, Л.Я. Пилип, Л.А. Спиненко [и др.] // *Проблемы репродукции*. – 2013. – Т. 19, № 6. – С. 59–64.
- Hasshold T. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going / T. Hasshold, H. Hall, P. Hunt // *Hum Molecular Genet*. – 2007. – Vol. 16, N 2. – P. R203–R208.
- Nicolaidis P. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies / P. Nicolaidis, M. Petersen // *Hum Reprod*. – 1998. – Vol. 13. – P. 313–319.
- Health and Welfare of ART Children [ed. by A.G. Sutcliffe]. – Abingdon: Informa Healthcare, 2006. – 206 [P. 134] p.
- Papadopoulos G. The frequency of chromosome anomalies in human unfertilized oocytes and uncleaved zygotes after insemination in vitro / G. Papadopoulos, J. Randall, A.A. Templeton // *Hum. Reprod*. – 1989. – Vol. 4, N 5. – P. 568–573.
- Wang L. Detection of Chromosomal Aneuploidy in Human Pre-implantation Embryos by Next Generation Sequencing / L. Wang, X. Wang, J. Zhang [et al.] // *Biology of reproduction*. – 2014. – doi: 10.1095/biolreprod.113.116459.
- Forman E.J. Single embryo transfer with comprehensive chromosome screening results in improved ongoing pregnancy rates and decreased miscarriage rates / E.J. Forman, X. Tao, K.M. Ferry [et al.] // *Hum reprod*. – 2012. – Vol. 27, N 4. – P. 1217–1222.
- Harper J.C. ESHRE PGD consortium data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008 / J.C. Harper, E. Coonen, M. De Rycke et al. // *Hum Reprod*. – 2010. – Vol. 25, N 11. – P. 2685–2707.
- Sermon K.D. ESHRE PGD Consortium data collection VI: cycles from January to December 2003 with pregnancy follow-up to October 2004 / K.D. Sermon, A. Michiels, G. Harton et al. // *Hum Reprod*. – 2007. – Vol. 22, N 2. – P. 323–336.
- Harper J. C. ESHRE PGD consortium data collection VII: cycles from January to December 2004 with pregnancy follow-up to October 2005 / J.C. Harper, C. de Die-Smulders, V. Goossens // *Hum Reprod*. – 2008. – Vol. 23, N 4. – P. 741–755.
- Goossens V. ESHRE PGD Consortium data collection VIII: cycles from January to December 2005 with pregnancy follow-up to October 2006 / V. Goossens, G. Harton, C. Moutou et al. // *Hum Reprod*. – 2008. – Vol. 23, N 2. – P. 2629–2645.
- Goossens V. ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007 // V. Goossens, G. Harton, C. Moutou et al. // *Hum Reprod*. – 2009. – Vol. 24, N 8. – P. 1786–1810.
- Pagidas P. Predictive value of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in repeated IVF-ET cycles among women with recurrent implantation failure / P. Pagidas, Y. Ying, D. Keefe // *J Assist Reprod*

- Genet. – 2008. – Vol. 25, N 2–3. – P. 103–106.
39. Werlin L. Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology / L. Werlin, I. Rodi, A. DeCherney [et al.] // Fertility and Sterility. – 2003. – Vol. 80, N 2. – P. 467–468.
40. Munnй S. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages / S. Munnй, S. Chen, J. Fischer [et al.] // Fertility and Sterility. – 2005. – Vol. 84, N 2. – P. 331–335.
41. Munnй S. Referring Centers PGD Group. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study / S. Munnй, J. Fischer, A. Warner [et al.] // Fertility and Sterility. – 2006. – Vol. 85, N 2. – P. 326–332.
42. Kahraman S. Effect of PGD on implantation and ongoing pregnancy rates in cases with predominantly macrocephalic spermatozoa / S. Kahraman, S. Sertyel, N. Findikli [et al.] // Reproductive BioMedicine Online. – 2004. – Vol. 9, N 1. – P. 79–85.
43. Munnй S. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos / S. Munnй, C. Magli, J. Cohen [et al.] // Human Reproduction. – 1999. – Vol. 14, N 9. – P. 2191–2199.
44. Schoolcraft W.B. Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial / W.B. Schoolcraft, M.G. Katz-Jaffe, J. Stevens [et al.] // Fertility and Sterility. – 2009. – Vol. 92, N 1. – P. 157–162.
45. Staessen C. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial / C. Staessen, P. Platteau, E. Van Assche [et al.] // Human Reproduction. – 2004. – Vol. 19, N 12. – P. 2849–2858.
46. Mastenbroek S. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening / S. Mastenbroek, M. Twisk, J. van Echten-Arends [et al.] // The New England Journal of Medicine. – 2007. – Vol. 357, N 1. – P. 9–17.
47. Hardarson T. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial / T. Hardarson, C. Hanson, K. Lundin et al. // Human Reproduction. – 2008. – Vol. 23, N 12. – P. 2806–2812.
48. Platteau P. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in patients with unexplained recurrent miscarriages // P. Platteau, C. Staessen, A. Michiels, A. Van Steirteghem, I. Liebaers, and P. Devroey // Fertility and Sterility. – 2005. – Vol. 83, N 2. – P. 393–397.
49. Blockeel C. Prospectively randomized controlled trial of PGS in IVF/ICSI patients with poor implantation / C. Blockeel, V. Schutyser, A. De Vos [et al.] // Reproductive BioMedicine Online. – 2008. – Vol. 17, N 6. – P. 848–854.
50. Gleicher N. Preimplantation genetic screening (PGS) still in search of a clinical application: a systematic review / N. Gleicher, V.A. Kushnir, D.H. Barad // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2014. – Vol. 12, N 22. – P. 1–8.
51. Cohen J. Multicentre trial of preimplantation genetic screening reported in the New England Journal of Medicine: an in-depth look at the findings / J. Cohen, J.A. Grifo // Reproductive BioMedicine Online. – 2007. – Vol. 15, N 4. – P. 365–366.
52. Franasiak J.M. Embryonic aneuploidy: overcoming molecular genetics challenges improves outcomes and changes practice patterns / J.M. Franasiak, R.T. Scott // Trends in Molecular Medicine. – 2014. – Vol. 20, N 2. – P. 499–508.
53. Munne S. Technology requirements for preimplantation genetic diagnosis to improve assisted reproduction outcomes / S. Munne, D. Wells, J. Cohen // Fertility and Sterility. – 2010. – Vol. 94. – P. 408–430.
54. Velila E. Blastomere fixation techniques and risk of misdiagnosis for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy / E. Velila, T. Escudero, S. Munne // Reprod. Biomed. Online. – 2002. – Vol. 4, N 3. – P. 210–217.
55. Wilton L. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD / L. Wilton, A. Thornhill, J. Traeger-Synodinos [et al.] // Hum. Reprod. – 2009. – 24, N 5. – P. 1221–1228.
56. Thornhill A.R. ESHRE PGD Consortium 'best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS) / A.R. Thornhill; C.E. deDie-Smulders; J.P. Geraedts [et al.] // Human Reproduction. – 2005. – Vol. 20, N 1. – P. 35–48.
57. Микитенко Д.О. Порівняльна генетична гібридизація: новий стандарт діагностики в репродуктивній медицині / Д.О. Микитенко, В.Д. Зукін // Здоровье женщины. – 2010. – № 9 (55). – С. 183–187.
58. Fragouli E. Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure / E. Fragouli, M. Katz-Jaffe, S. Alfarawati et al. // Fertil Steril. – 2010. – Vol. 94, N 3. – P. 875–887.
59. Alfarawati S. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis / S. Alfarawati, E. Fragouli, P. Colls, D. Wells // Hum Reprod. – 2011. – Vol. 26, N 6. – P. 1560–1574.
60. Kahraman S. Medical and social perspectives of PGD for single gene disorders and human leukocyte antigen typing / S. Kahraman // RBM online. – 2007. – Vol. 14, Supl. 1. – P. 104–108.
61. Fiorentino F. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization / F. Fiorentino, L. Spizzichino, S. Bono et al. // Hum Reprod. – 2011. – Vol. 26, N 7. – P. 1925–1935.
62. Valli R. Comparative genomic hybridization on microarray (a-CGH) in constitutional and acquired mosaicism may detect as low as 8% abnormal cells / R. Valli, Marletta C., Pressato B. [et al.] // Molecular Cytogenet. – 2011. – Vol. 4, N 13. – P. 1–6.
63. Mamas T. Detection of aneuploidy by array comparative genomic hybridization using cell lines to mimic a mosaic trophectoderm biopsy / T. Mamas, A. Gordon, A. Brown [et al.] // Fertil Steril. – 2012. – Vol. 97. – P. 943–947.
64. Northrop L.E. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts / L.E. Northrop, N.R. Treff, B. Levy, R.T. Scott Jr // Molecular Human Reproduction. – 2010. – Vol. 16, N 8. – P. 590–600.
65. Karyomapping. – 2014. – Электронный ресурс. – Режим доступа: <http://www.cambridgebluegenome.com/products/karyomapping>.
66. Микитенко Д.А. Оценка явления межхромосомного эффекта у эмбрионов пациентов с хромосомными аномалиями методом полногеномного скрининга / Д.А. Микитенко, Л.Я. Пилип, В.Д. Зукін, К.В. Лаврова // Редкие (орфанные) заболевания и врожденные пороки развития. Современные возможности диагностики, профилактики, лечения и реабилитации. К 45-летию Медико-генетического центра. – Санкт-Петербург, 2014. – С. 340–347.

Статья поступила в редакцию 21.10.2014