

ГОНТАРЬ Ю.В.<sup>1,2✉</sup>, ВЕРЛИНСКИЙ О.Ю.<sup>1</sup>, КИРПИЙ А.<sup>3</sup>, ИЛЬИН И.Е.<sup>1</sup>, ФЕДОТА А.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ООО «Медицинский центр ИГР»,

Украина, 03115, г. Киев, проспект Победы, 121-Б, e-mail: genetics-J@yandex.ru

<sup>2</sup> Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина,

Украина, 61022, г. Харьков, площадь Свободы, 4, e-mail: afedota@mail.ru

<sup>3</sup> «Thermo Fisher Scientific»,

Россия, 117485, г. Москва, ул. Обручева, 30/1, 2, e-mail: alexander.kirpiy@thermofisher.com

✉ genetics-J@yandex.ru, (067) 727-93-75

## СРАВНЕНИЕ NGS И FISH ТЕХНОЛОГИЙ: КОМПЛЕКСНЫЙ СКРИНИНГ 24 ХРОМОСОМ ЭМБРИОНОВ

Развитие методов генетического анализа в области вспомогательных репродуктивных технологий обеспечивает увеличивающееся количество и детализацию информации о характеристиках эмбрионов, которая в настоящее время не всегда совпадает с пониманием перспектив эмбриона [1]. С этической точки зрения, возрастающая сложность и объем данных, получаемых с помощью комплексных методов тестирования, ведут к возникновению проблем с принципами репродуктивной автономии и правом ребенка на открытое будущее и подразумевают возможную большую ответственность специалистов в благополучии будущего ребенка и семьи. В связи с этим возникает необходимость в тщательном переосмыслении традиционных этических парадигм в отношении генетической и медицинской помощи при размножении человека [2]. С технологической точки зрения, несмотря на сходную цель молекулярного кариотипирования эмбриона, не все методы современного комплексного скрининга хромосом CCS (comprehensive chromosome screening) одинаковы по своей информативности. Выбор используемого метода, необходимость получения ряда характеристик и уровня результатов и доказательств определяются конкретными задачами исследования [3], возможностями исследователей и экономической целесообразностью. Кроме того, повышение эффективности и результативности исследований эмбрионов с применением методов микроскопии, молекулярного кариотипирования, протеомики и морфокинетики позволяет избежать этических и технических рисков многоплодной беременности. Переход к переносу единичных эмбрионов для всех пациентов будет в значительной

степени способствовать развитию возможностей количественно и качественно оценивать жизнеспособность эмбриона [1].

Трансфер единичных эмбрионов подразумевает использование не только временных и морфологических критериев при стратегии выбора эмбриона. Известно, что традиционная морфологическая оценка дает лишь умеренное прогнозирование способности эмбриона к имплантации и отличается относительной ограниченной специфичностью и чувствительностью, субъективностью и, таким образом, не может представлять собой действительно объективный количественный маркер [4, 5].

При селекции эмбрионов наиболее целесообразным представляется проведение комплексного исследования генетических параметров с использованием при необходимости нескольких методов. В современной литературе представлены анализ результатов CGH arrays (comparative genomic hybridization arrays) и FISH (fluorescent *in situ* hybridisation), SNP arrays (single nucleotide polymorphism arrays), qPCR (quantitative polymerase chain reaction) и NGS (next generation sequencing) [6, 7], однако описанные данные немногочисленны и неоднозначны.

В связи с этим целью данного исследования стала оптимизация алгоритма комплексного скрининга 24 хромосом эмбрионов для повышения его эффективности в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

### Материалы и методы

Сбор первичной информации и лабораторные исследования проводились на базе ООО «Медицинский центр ИГР» (г. Киев). При проведении генетического анализа использовалась

первичная информация о пациентах, медицинская документация, клетки трофктодермы ранних эмбрионов. Исследование выполнялось в рамках программ вспомогательных репродуктивных технологий с применением ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) и преимплантационной генетической диагностики (ПГД). Материал для преимплантационного скрининга был получен на 5-е сутки после оплодотворения ооцитов путем аспирации клеток трофктодермы ранних эмбрионов. [8]. При проведении ПГД на ядрах клеток трофктодермы использовался метод FISH. После фиксации на предметном стекле наносились флуоресцентные ДНК-зонды в зону, где находились ядра клеток эмбриона. Использованы зонды для хромосом 13, 16, 18, 21, 22, X, Y, исследования которых обеспечивают коммерческие наборы РВ «MultiVysion» и «СерХ/СерУ» («Abbott-Vysis», США) [9]. Микроскопический анализ осуществлялся с использованием флуоресцентного микроскопа и программы автоматической обработки изображения ISIS («Meta Systems»,

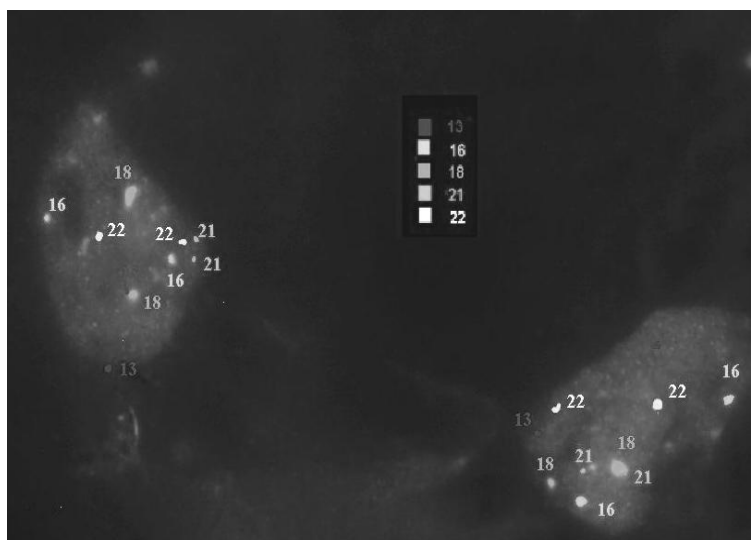
ФРГ) [10]. Секвенирование нового поколения выполнялось с использованием системы полупроводникового секвенатора Ion S5™ («Thermo Fisher Scientific», США) по протоколу к наборам «Ion Singleseq Kit» для выявления анеуплоидий.

### Результаты и обсуждение

Нами проанализированы результаты исследования 5-суточных эмбрионов с различными генетическими характеристиками, установленными при выполнении FISH-гибридизации, – эуплоидные, анеуплоидные, мозаичные по плоидности. Далее для образцов был проведен комплексный скрининг 24 хромосом по технологии секвенирования нового поколения (NGS-based CCS). Нами представлены наиболее актуальные примеры исследования цитогенетических параметров эмбрионов.

Эуплоидный набор хромосом образца, выявленный с помощью NGS, был подтвержден результатами флуоресцентной гибридизации *in situ* (рис. 1 а, б).

а)



б)

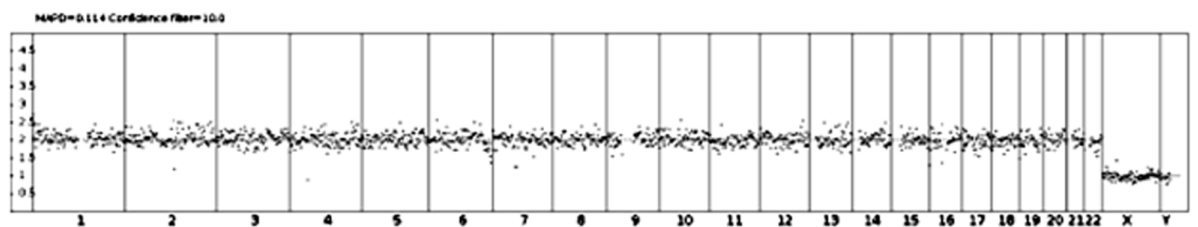


Рис. 1. а) изображение интерфазных ядер клеток трофктодермы с флуоресцентными метками хромосом 13, 16, 18, 21, 22, соответствует эуплоидному набору хромосом, набор «MultiVysion PB» («Abbott-Vysis», USA), увеличение 10x100 (ориг.); б) результаты секвенирования того же образца, эуплоидный набор хромосом.

Секвенирование ДНК эмбриона, имеющего обнаруженные при анализе методом FISH моносомии по хромосомам 18 и 22 (рис. 2 а), выявило моносомию по хромосоме 18, но, в то же время, моносомия по хромосоме 22 была идентифицирована как норма – показатели распределения количества ДНК находились в пределах «серой зоны» (рис. 2 б).

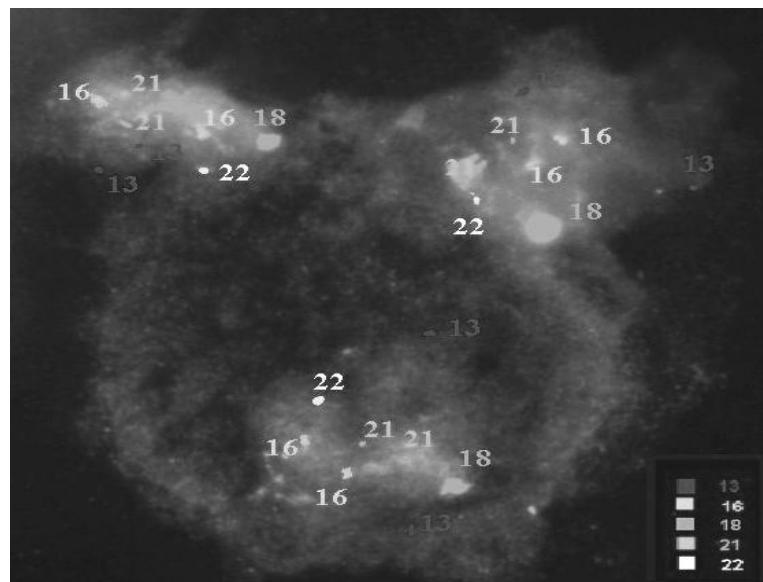
Секвенирование образца, в котором был выявлен мозаицизм по плоидности набора хромосом в ядрах клеток трофобластической оболочки методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (рис. 3 а), показало, что результат исследования не отличается от кривой образца с нормальным кариотипом (рис. 3 б).

В то же время, по данным ряда авторов, расхождение результатов при анализе кари-

отипа эмбрионов, например, методами CGH и FISH составило 1,9% [6]. Проведение сравнительной геномной гибридизации для отдельных клеток эмбрионов, ранее диагностированных как аномальные, методом FISH продемонстрировало высокие показатели совпадения [7]. Однако эти же авторы полагают, что не следует рассматривать метод FISH как достаточный для валидации и подтверждения результатов CCS [6, 7].

Известно, что мозаицизм является важной характеристикой, которую, по данным [11], следует учитывать и исследовать при последовательном анализе нескольких образцов одного и того же эмбриона.

а)



б)

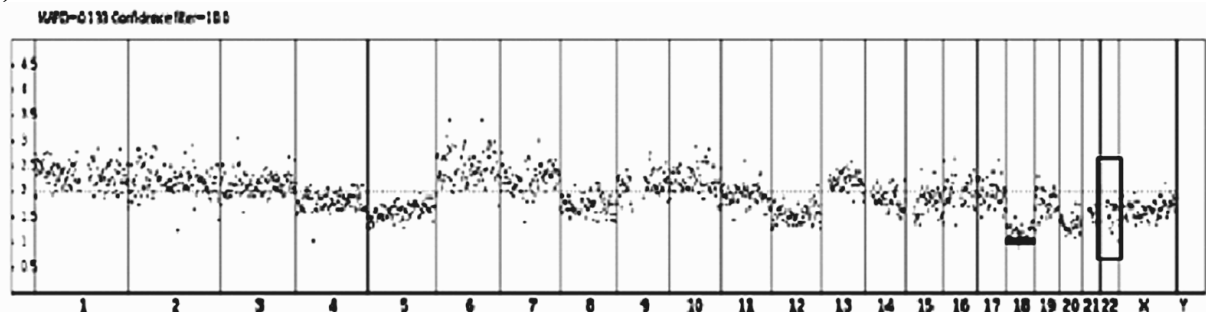
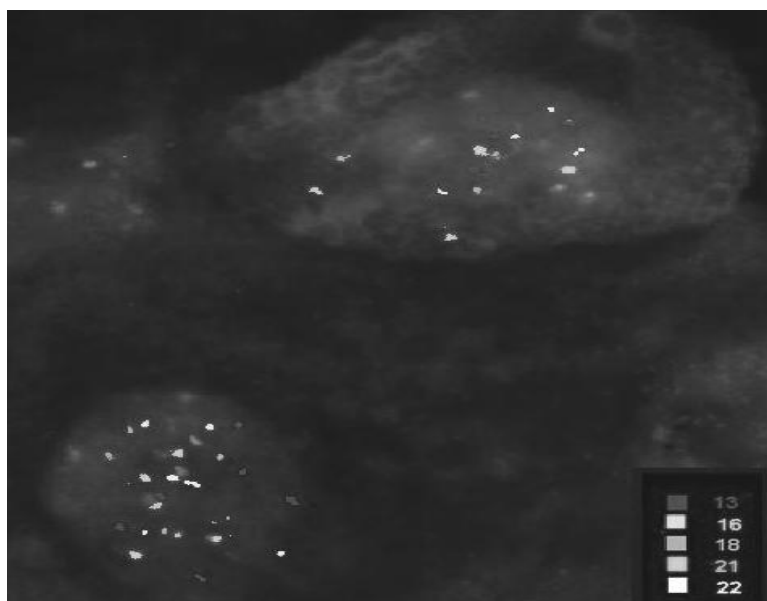


Рис. 2. а) изображение интерфазных ядер клеток трофобластической оболочки с флуоресцентными метками хромосом 13, 16, 18, 21, 22, соответствует анеуплоидиям хромосом 18 и 22, набор «MultiVysion PB» («Abbott-Vysis», USA), увеличение 10x100 (ориг.); б) результаты исследования секвенирования того же образца, показана моносомия 18, не показана моносомия 22.

а)



б)

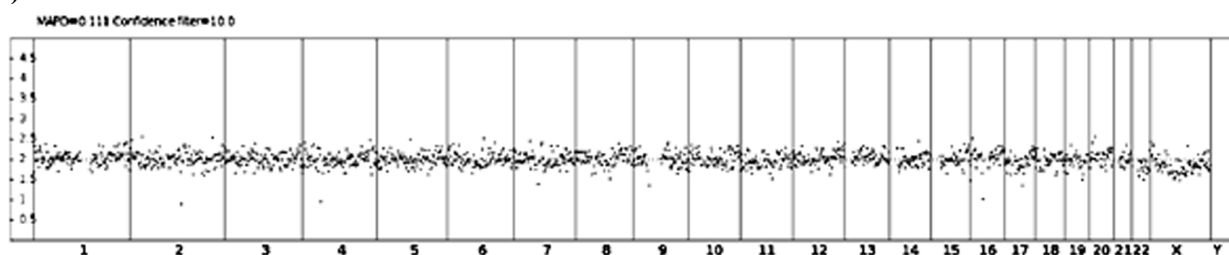


Рис. 3. а) изображение интерфазных ядер клеток трофобласты с флуоресцентными метками хромосом 13, 16, 18, 21, 22, соответствует полиплоидному набору хромосом (4n и 6n), набор «MultiVysion PB» («Abbott-Vysis», USA), увеличение 10x100 (ориг.); б) результаты исследования секвенирования нового поколения того же образца, показан эуплоидный набор хромосом.

В связи с этим, по мнению исследователей, одним из способов выявления истинного мозаицизма при комплексном скрининге хромосом может стать оценка эмбриона, для которого уже были проведены две последовательные диагностики после двух отдельных биопсий с использованием альтернативных методологий исследования хромосом [1, 3].

### Выводы

NGS-based CCS позволяет оптимизировать технологическую сторону исследования кариотипа эмбриона, в то же время снижает возможность детекции мозаицизма, отдельных видов полиплоидий, анеуплоидий. Верификация результата методом FISH позволяет выявить истинный мозаицизм и нарушения ploidy эмбриона.

### Литература

1. Gardner D., Meseguer M., Rubio C., Treff N. Diagnosis of human preimplantation embryo viability // *Hum. Reprod.* – 2015. – V. 21, № 6. – P. 727–747.
2. Hens K., Dondorp W., Handyside A., Harper J., Newson A., Pennings G., Rehmann-Sutter C., de Wert G. Dynamics and ethics of comprehensive preimplantation genetic testing: a review of the challenges // *Hum. Reprod.* – 2013. – V. 19, № 4. – P. 366–375.
3. Treff N. Genome-wide analysis of human preimplantation aneuploidy // *Semin. Reprod. Med.* – 2012. – V. 30. – P. 283–288.
4. Bendus B., Mayer A., Shipley J., Catherino S. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading // *Fertil. Steril.* 2006. – V. 86. – P. 1608–1615.
5. 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 // *Fertil. Steril.* – 2014. – V. 102. – P. 1287–1294.

6. Gutierrez-Mateo C., Colls P., Sanchez-Garcia J., Escudero T., Prates R., Ketterson K., Wells D., Munne S. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos // *Fertil. Steril.* – 2011. – V. 95. – P. 953–958.
7. Mir P., Rodrigo L., Mercader A., Buendia P., Mateu E., Milan-Sanchez M., Peinado V., Pellicer A., Remohi J. et al False positive rate of an arrayCGH platform for single-cell preimplantation genetic screening and subsequent clinical application on day-3 // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2013. – V. 30. – P. 143–149.
8. 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 Reprod.* – 2010. – V. 1. – P. 1–8.
9. Lichter P., Ried T. Chapter 25. Molecular analysis of chromosome aberrations in situ hybridization // *Methods in molecular biology* / J.M. Walker (ed.). – Totowa, NJ: Humana Press, 2010. – V. 29: Chromosome analysis protocols / J.R. Gosden (ed.). – P. 449–478.
10. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. Медицинская цитогенетика. – М., 2006. – С. 219–222.
11. Taylor T., Gitlin S., Patrick J., Crain J., Wilson J., Griffin D. The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans // *Hum. Reprod.* – 2014. – V. 20. – P. 571–581.

**GONTAR J.V.<sup>1,2</sup>, VERLINSKY O.Yu.<sup>1</sup>, KIRPIY A.<sup>3</sup>, ILYIN I.E.<sup>1</sup>, FEDOTA O.M.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Medical Center IGR,*

*Ukraine, 03115, Kyiv, Pobedy ave., 121-B, e-mail: genetics-J@yandex.ru*

<sup>2</sup> *V.N. Karazin Kharkiv National University,*

*Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody Sq., 4, e-mail: afedota@mail.ru*

<sup>3</sup> *«Thermo Fisher Scientific»,*

*Russia, 117485, Moscow, Obrucheva str., 30/1, 2, e-mail: alexander.kirpiy@thermofisher.com*

#### **A COMPARISON OF NGS AND FISH TECHNOLOGIES: COMPREHENSIVE 24-CHROMOSOME SCREENING OF EMBRYO**

**Aim.** Optimization of the algorithm of complex 24 chromosomes screening in programs of assisted reproductive technologies. **Methods.** Research of non-disjunction chromosomes in preimplantation embryos based on the results of trophoctoderm nucleus diagnostics using FISH and NGS-based CCS. During the preimplantation genetic diagnosis (PGD) on the nucleus by FISH were used probes for chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X, Y. **Results.** Among the demonstrated cases of embryo diagnosis there was only one embryo that showed a coincidence in the results obtained by different investigation methods. In the other sample, where was diagnosed non-mosaic 18 and 22 monosomy by FISH, the NGS-based CCS showed only monosomy 18. The other embryo had ploidy mosaicism indicated by FISH, but according to NGS results it was evaluated as euploid. **Conclusions.** Embryos obtained in ART programs must be screened for chromosomal aneuploidy in the preimplantation period to increase the effectiveness in the programs of assisted reproductive technologies, using combination of FISH and NGS methods.

**Keywords:** preimplantation genetic diagnosis, assisted reproductive technologies, aneuploid embryos, NGS, FISH.