

# Лечение бесплодия методами экстракорпорального оплодотворения и преимплантационного генетического тестирования у женщины с кариотипом 46,XX,ins(13;4)(q34;p14p15.3),inv(4)(p14q12).

## Клинический случай

Ж.И. Глинкина<sup>✉1</sup>, Е.В. Кулакова<sup>2</sup>, **Е.Г. Лебедева**<sup>3</sup>, В.С. Кузьмичева<sup>4</sup>, Н.П. Макарова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ООО «Хайтек Генетикс», Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия;

<sup>3</sup>Клинический госпиталь MD GROUP, Москва, Россия;

<sup>4</sup>ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии», Москва, Россия

### Аннотация

Частота структурных хромосомных перестроек среди пациентов с нарушениями репродуктивной функции может составлять от 1,8 до 8%. К одним из наиболее редких хромосомных патологий относятся инсерция (вставка хромосомного участка) и инверсия (поворот участка хромосомы). В настоящей работе описан клинический случай программы лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий у женщины с редкой хромосомной перестройкой: инсерция и инверсия хромосом одновременно – 46,XX, ins(13;4)(q34;p14p15.3), inv(4)(p14q12). Определены структура и частота хромосомных aberrаций методом высокопроизводительного секвенирования у преимплантационных эмбрионов. Результат анализа секвенирования показал, что несбалансированные варианты по известной патологии составили 9 (56,3%) из 16 наблюдений, при этом в 6 (37%) только по известной в кариотипе патологии и в 3 (19%) представлены одновременно с патологией других хромосом или с мозаицизмом. По итогам исследования, у преимплантационных эмбрионов, где один из родителей имеет хромосомные нарушения, помимо несбалансированных вариантов встречается анеуплоидия других хромосом, не вовлеченных в известную патологию. Они описаны в 3 (21%) из 14 наблюдений всей выявленной патологии. В связи с этим пациентам с aberrациями в кариотипе рекомендуется по возможности проводить преимплантационное генетическое тестирование структурных перестроек методами, позволяющими анализировать одновременно все хромосомы. Например, высокопроизводительное секвенирование на платформе Illumina, возможно, станет альтернативой пренатальной диагностике, которая проводится фертильным парам с высоким риском рождения ребенка с наследственной или врожденной патологией. В случае выявления у плода хромосомных изменений перед пациентами встает ряд этических вопросов, связанных с необходимостью проведения медицинского аборта, что может противоречить их религиозным и моральным убеждениям.

**Ключевые слова:** вспомогательные репродуктивные технологии, преимплантационное генетическое тестирование, нарушение кариотипа, анеуплоидии, имплантация эмбриона

**Для цитирования:** Глинкина Ж.И., Кулакова Е.В., Лебедева Е.Г., Кузьмичева В.С., Макарова Н.П. Лечение бесплодия методами экстракорпорального оплодотворения и преимплантационного генетического тестирования у женщины с кариотипом 46,XX,ins(13;4)(q34;p14p15.3),inv(4)(p14q12). Клинический случай. Гинекология. 2021; 23 (5): 441–444. DOI: 10.26442/20795696.2021.5.201010

### CASE REPORT

## In vitro fertilization and preimplantation genetic testing methods in infertility treatment of a woman with karyotype 46,XX,ins(13;4)(q34;p14p15.3),inv(4)(p14q12). Case report

Zhanna I. Glinkina<sup>✉1</sup>, Elena V. Kulakova<sup>2</sup>, **Elena G. Lebedeva**<sup>3</sup>, Varvara S. Kuzmicheva<sup>4</sup>, Nataliya P. Makarova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hi-Tech Genetics Ltd., Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Clinical hospital MD GROUP, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Moscow, Russia

### Abstract

The frequency of structural chromosomal transpositions can range from 1.8 to 8% among patients with reproductive disorders. There are several types of the rarest chromosomal abnormalities: insertion (insertion of a chromosomal region) and inversion (rotation of a chromosome region). This article describes a clinical case of the

### Информация об авторах / Information about the authors

<sup>✉</sup>**Глинкина Жанна Ивановна** – д-р биол. наук, ген. дир. ООО «Хайтек Генетикс». E-mail: janna435@yandex.ru; ORCID: 0000-0003-0312-3797

<sup>✉</sup>**Zhanna I. Glinkina** – D. Sci. (Biol.), Hi-Tech Genetics Ltd. E-mail: janna435@yandex.ru; ORCID: 0000-0003-0312-3797

**Кулакова Елена Владимировна** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отд-ния вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: e\_kulakova@oparina4.ru; ORCID: 0000-0002-4433-4163

**Elena V. Kulakova** – Cand. Sci. (Med.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: e\_kulakova@oparina4.ru; ORCID: 0000-0002-4433-4163

infertility treatment using assisted reproductive technologies in a woman with a rare chromosomal abnormality: simultaneous insertion and inversion of chromosomes – 46, XX, ins(13;4)(q34;p14p15.3), inv(4)(p14q12). The structure and frequency of chromosomal aberrations were determined by high-throughput sequencing in preimplantation embryos. The result of the sequencing analysis showed that unbalanced variants for a known pathology were detected in 9 (56.3%) out of 16 observations, while in 6 (37%) only for a pathology known in the karyotype and in 3 (19%) they were presented simultaneously with the pathology of other chromosomes or with mosaicism. According to the results of the study, in preimplantation embryos, where one of the parents had chromosomal abnormalities, in addition to unbalanced variants, there is aneuploidy of other chromosomes not involved in the known pathology. They are described in 3 (21%) out of 14 observations of all identified pathology. In this regard, patients with aberrations in the karyotype are recommended, whenever possible, to carry out preimplantation genetic testing of structural rearrangements by methods allowed to analyze all chromosomes simultaneously. For example, high-throughput sequencing on the Illumina platform may become an alternative for prenatal diagnostics, which is performed in fertile couples with high risk of having a child with hereditary or congenital disorders. In the case of detection of chromosomal changes in the fetus, patients are faced with a number of ethical issues related to the necessity for medical abortion, which may contradict their religious and moral convictions.

**Keywords:** assisted reproductive technologies, preimplantation genetic testing, abnormal karyotype, aneuploidy, embryo implantation

**For citation:** Glinkina ZhI, Kulakova EV, Lebedeva EG, Kuzmicheva VS, Makarova NP. In vitro fertilization and preimplantation genetic testing methods in infertility treatment of a woman with karyotype 46,XX,ins(13;4)(q34;p14p15.3),inv(4)(p14q12). Case report. *Gynecology*. 2021; 23 (4): 441–444. DOI: 10.26442/20795696.2021.5.201010

## Введение

В настоящее время исследователями разных стран показано, что у пациентов с различными нарушениями репродуктивной функции (НРФ) изменения в хромосомном наборе встречаются в разы чаще, чем в популяции. Цитогенетическое исследование лимфоцитов крови (исследование кариотипа) является «золотым стандартом» генетического обследования супружеских пар с НРФ. В общей популяции изменения в кариотипе встречаются с частотой  $1,77 \pm 0,06\%$  [1]. Частота структурных перестроек в хромосомах у пациентов с НРФ наблюдается в 2,37% случаев [2]. В настоящее время известно о 800 вариантах хромосомных аномалий, связанных с изменением числа хромосом или их структуры. Одними из редких хромосомных патологий являются инсерция (вставка хромосомного участка) и инверсия (поворот участка хромосомы) [3].

Как правило, сбалансированные хромосомные перестройки не влияют на здоровье их носителей. Однако у людей с измененным кариотипом в процессе деления клетки могут формироваться гаметы с несбалансированными вариантами хромосомных перестроек. Эмбрионы, полученные в результате оплодотворения таких половых клеток, будут иметь патологию в хромосомном наборе, которая может приводить к остановке развития беременности, самопроизвольному ее прерыванию, а также являться причиной рождения генетически больного ребенка. Именно поэтому хромосомные изменения в кариотипе пациентов, проходящих лечение в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), могут приводить к снижению эффективности этих программ.

С целью профилактики рождения больного ребенка и невынашивания беременности в рамках программ ВРТ необходимо применять преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии в эмбрионах (ПГТ-А). А у пациентов с нарушениями в кариотипе целесообразным является исследование хромосом, вовлеченных в перестройку, т.е. преимплантационное генетическое тестирование структурных перестроек (ПГТ-СП).

До настоящего времени наиболее распространенными методами ПГТ-СП являлись флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), количественная флуоресцентная полимеразная цепная реакция (КФ-ПЦР), сравнительная геномная гибридизация (arr-CGH). Однако данные методики имеют ряд принципиальных ограничений и не всегда отражают полную картину молекулярного кариотипа. Последние годы широкое распространение приобрел современный метод высокопроизводительного секвенирования (NGS), который все больше вытесняет другие методы преимплантационного генетического тестирования в зарубежных и российских клиниках ВРТ. NGS более точно обнаруживает и анеуплоидии, и делеции/дупликации. Принцип данного метода построен на распознавании последовательности нуклеиновых кислот, что существенно отличает его от других тактик.

В настоящей работе описан клинический случай программы лечения бесплодия методами ВРТ у пациентки с аномальным кариотипом 46,XX,ins(13;4)(q34;p14p15.3),inv(4)(p14q12), сочетающим инсерцию и инверсию. Также в работе определены структура и частота хромосомных aberrаций в преимплантационных эмбрионах нескольких программ стимуляции овуляции методом NGS.

## Описание клинического случая

В 2020 г. пациентка 3. 37 лет обратилась с жалобами на отсутствие наступления беременности в течение 5 лет регулярной половой жизни без контрацепции. Из анамнеза: менструации с 17 лет, цикл регулярный по 5 дней через 26 дней без особенностей. В 2015 г. проведена лапароскопия с резекцией правого яичника по поводу эндометриозной кисты. У женщины выявлены бронхоэктатическая болезнь и желудочковая экстрасистолия, гипотиреоз. При цитогенетическом анализе кариотипа пациентки выявлены изменения в виде инсерции и инверсии одновременно: 46,XX,ins(13;4)(q34;p14p15.3),inv(4)(p14q12). Наследственность не отягощена. Кариотип родителей женщины и родного брата в норме. Муж пациентки 44 лет, соматически здоров, детей нет, показатели спермограммы: объем 3 мл,

Lebedeva Elena Genadievna – врач акушер-гинеколог отд-ния экстракорпорального оплодотворения Клинического госпиталя MD GROUP. E-mail: elena.g.lebedeva@mail.ru; ORCID: 0000-0002-8010-412X

Kuzmicheva Varvara Sergeevna – аспирант отд-ния репродуктологии ГБУЗ МО МОНИИАГ. E-mail: barbarakuzmicheva@gmail.com; ORCID: 0000-0002-3797-6360

Makarova Natalya Petrovna – д-р биол. наук, вед. науч. сотр. отд-ния вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: np\_makarova@oparina4.ru; ORCID: 0000-0003-1396-7272

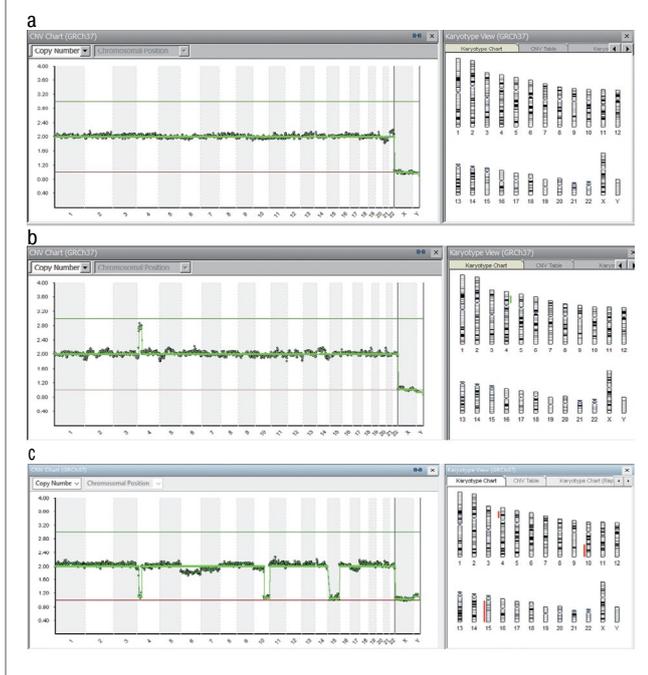
Elena G. Lebedeva – obstetrician-gynecologist, Clinical Hospital MD GROUP. E-mail: elena.g.lebedeva@mail.ru; ORCID: 0000-0002-8010-412X

Varvara S. Kuzmicheva – Graduate Student, Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology. E-mail: barbarakuzmicheva@gmail.com; ORCID: 0000-0002-3797-6360

Nataliya P. Makarova – D. Sci. (Biol.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: np\_makarova@oparina4.ru; ORCID: 0000-0003-1396-7272

**Рис. 1. Пример результатов анализов секвенирования клеток трофэктодермы методом NGS на платформе Illumina в программе BlueFuse Multi у пациентки с кариотипом 46,XX,ins(13;4)(q34;p14p15.3),inv(4)(p14q12): a – Seq(1-22)x2,(XY)x1, нормальный молекулярный кариотип; b – Seq(4p15.31-4p14)x3,(XY)x1, выявлен дополнительный генетический материал участка 4p15.31-4p14 хромосомы 4; c – Seq(4p15.32 -> 4p14)x1,(10q23.31 -> 10q26.3)x1,(15)x1,(XY)x1, выявлена недостача генетического материала участка 4p15.31-4p14 хромосомы 4, участка 10q23.31 -> 10q26.3 хромосомы 10 и моносомия хромосомы 15.**

**Fig. 1. An example of the test results of the trophoctoderm cells sequencing in a patient with a karyotype 46, XX, ins (13;4) (q34;p14p15.3), inv(4)(p14q12) by NGS on the Illumina platform using BlueFuse Multi software: a – Seq(1-22)x2,(XY)x1, normal molecular karyotype; b – Seq(4p15.31-4p14)x3,(XY)x1, additional genetic material of the 4p15.31-4p14 region of chromosome 4; c – Seq(4p15.32 -> 4p14)x1,(10q23.31 -> 10q26.3)x1,(15)x1,(XY)x1, a lack of genetic material of the 4p15.31-4p14 region of chromosome 4, the 10q23region.31 -> 10q26.3 chromosome 10 and monosomy of chromosome 15.**



концентрация сперматозоидов 30 млн/мл, подвижных сперматозоидов 82%, морфологически нормальных форм 4%. Брак у обоих супругов первый, не родственники. Пациенты изъявили желание на проведение программы ВРТ с ПГТ-СП методом NGS.

Женщине провели 3 цикла стимуляции по стандартному протоколу с антагонистами гонадотропин-рилизинг-гормона с применением препаратов Гонал-Ф, Оргалутран, Диферелин. После осуществления оплодотворения методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) ооциты перенесены в культуральную среду CSCM (Irvine Sc., США) с целью дальнейшего культивирования. Оценку наступления стадии двух пронуклеусов (формиро-

вания зиготы) проводили через 14–16 ч после оплодотворения. Все этапы культивирования осуществляли в мультигазовых инкубаторах COOK (Ирландия) в каплях по 25 мкл под маслом (Irvine Sc., США). Среду CSCM (Irvine Sc., США) не меняли в течение 4 сут культивирования. На 5-е сутки после оплодотворения провели процедуру биопсии трофэктодермы для выполнения ПГТ-А и ПГТ-СП по показаниям. В 1-м цикле ВРТ получили 3 эмбриона, пригодных для ПГТ-СП, во 2 и 3-м – 7 и 6 соответственно. Всего для анализа после секвенирования доступно 16 эмбрионов. Они подверглись криоконсервации методом витрификации на средах Kitazato, хранение в условиях жидкого азота.

Перед секвенированием осуществлялась полногеномная амплификация ДНК-клеток трофэктодермы. С помощью электрофореза проводился анализ качества полученного продукта WGA. ПГТ-СП осуществлялся методом NGS на приборе MiSeq компании Illumina с применением коммерческого набора VeriSeq PGS Kit. Данные, полученные прибором, обрабатывались с помощью программного обеспечения BlueFuse Multi.

По результатам ПГТ-А и ПГТ-СП, выполненных по методике NGS, с нормальным молекулярным кариотипом было 2 эмбриона: по одному в 1-м цикле ВРТ и 3-м цикле стимуляции. Фото профилей секвенирования в программе BlueFuse Multi представлены на рис. 1. В результате переноса здорового эмбриона в 1-м цикле стимуляции беременность не наступила. Здоровый эмбрион, полученный в 3-м цикле стимуляции, до настоящего времени хранится в условиях жидкого азота.

Спектр хромосомной патологии во всех преимплантационных эмбрионах, выявленный при NGS, представлен в табл. 1.

Результат анализа секвенирования показал, что несбалансированные варианты по известной патологии составили 9 (56,3%) наблюдений из 16, при этом в 6 (37%) только по известной в кариотипе патологии и в 3 (19%) представлены одновременно с патологией других хромосом или с мозаицизмом. Эмбрионы с анеуплоидией хромосом, не вовлеченных в хромосомную перестройку, показаны в 3 (21%) наблюдениях из всей выявленной патологии (14 случаев).

При переносе эмбриона с нормальным молекулярным кариотипом, полученным в первой попытке ВРТ, беременность не наступила. В настоящее время пациентка готовится к переносу второго эмбриона с нормальным молекулярным кариотипом.

**Обсуждение**

Одними из наиболее сложных пациентов, нуждающихся в лечении бесплодия методами ВРТ, являются пары, где у одного из супругов имеются хромосомные aberrации. Из особенностей анамнеза данной группы пациентов можно отметить длительный период бесплодия, множественные неудачные попытки ВРТ, самопроизвольное прерывание беременности, а также рождение ребенка с врожденной хромосомной патологией. Дискутабельным среди специалистов разных стран остается вопрос о целесообразности применения программ ВРТ у пациентов с нарушениями

**Таблица 1. Структура хромосомной патологии, выявленной при секвенировании образцов клеток трофэктодермы**

**Table 1. The structure of chromosomal pathology detected by sequencing of trophoctoderm cell samples**

Не сбалансированные эмбрионы по известной перестройке	Не сбалансированные эмбрионы по известной перестройке с мозаицизмом	Эмбрионы, не сбалансированные по известной перестройке и с патологией других хромосом	Эмбрионы с анеуплоидией хромосом, не вовлеченных в хромосомную перестройку	Мозаицизм хромосом
6	2	1	3	2

в кариотипе и не имеющих бесплодия в анамнезе. По утверждению одних исследователей, у этих пар возможны наступление самопроизвольной беременности и рождение здорового ребенка без применения программ ВРТ, однако другие выступают против потенциального риска и заявляют о рациональности сокращения времени наступления беременности здоровым плодом. Для более глубокого понимания процесса мейоза у пациентов со структурными перестройками в хромосомном наборе необходимо проводить изучение кариотипа их эмбрионов. Результаты кариотипирования эмбрионов могут позволить разработать более точные методы преимплантационного тестирования и точнее рассчитать риски возникновения хромосомной патологии у ребенка. Данное исследование доказало, что применение NGS-секвенирования на платформе компании Illumina станет хорошим подготовительным этапом в ПГТ-СП. Эта платформа позволяет анализировать около 1 млн прочтений (ридов) в одном образце, что является принципиальным отличием от других компаний (в сравнении с 150–200 тыс. прочтений у других компаний). Увеличенное количество прочтений качественно влияет на точность выявления генетических нарушений. При направлении пациентов на ПГТ-СП необходимо не только придавать значение методу секвенирования, но и обращать внимание на платформу, на основе которой проводятся тестирования. По исследованиям других авторов, метод NGS у пациентов с измененным кариотипом значительно точнее выявляет хромосомные изменения у эмбрионов. Согласно ретроспективному тестированию продукта WGA после aCGH методом NGS выявлены изменения участков хромосом de novo и пониженный уровень мозаицизма, где aCGH находился в пределах нормативных значений [5]. И итоги авторов статьи, и данные других специалистов подтвердили, что метод NGS четко выявляет в эмбрионах мозаицизм, а также делеции, дупликации и анеуплоидии. В. Brunet и соавт. придерживаются этих результатов [6].

### Заключение

На основании полученных данных можно подтвердить, что ПГТ-СП методом NGS является одним из самых точных методов по определению хромосомных aberrаций у преимплантационных эмбрионов и должен быть рекомен-

дован у пар с измененным кариотипом в рамках программы ВРТ с целью профилактики невынашивания беременности, рождения больного ребенка.

Представленные в настоящей статье исследования показывают, что находки с хромосомными изменениями кариотипа возможны у преимплантационных эмбрионов пациентов в виде генетических изменений других хромосом (в частности, мозаицизма) помимо патологии, вовлеченных в перестройку хромосом, что подтверждается результатами других исследователей [4]. Наличие разнообразной группы хромосомных аномалий указывает на необходимость исследовать эмбрионы у этой группы пациентов на все хромосомы. Современной альтернативой на уровне с пренатальной диагностикой может явиться ПГТ-СП методом NGS у супружеских пар, которые имеют фактор риска рождения ребенка с врожденной или наследственной патологией, либо у категории пациентов, которые выступают против медицинского аборта по религиозным, моральным или другим мотивам.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

### Литература/References

1. Farkas G, Székely G, Vass N, et al. A spontán aneuploidia gyakorisága egészséges magyar populációban. *Magy Onkol.* 2015;59(3):198-204.
2. Pylyp LY, Spinenko LO, Verhoglyad NV, et al. Chromosomal abnormalities in patients with infertility. *Tsitol Genet.* 2015;49(3):33-9.
3. Gardner RJM, Amor DJ. Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 5th ed. Oxford University Press, 2018.
4. Wang J, Li D, Xu Z, et al. Analysis of meiotic segregation modes in biopsied blastocysts from preimplantation genetic testing cycles of reciprocal translocations. *Mol Cytogenet.* 2019;12:11.
5. Chow JFC, Yeung WSB, Lee VCY, et al. Evaluation of preimplantation genetic testing for chromosomal structural rearrangement by a commonly used next generation sequencing workflow. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2018;224:66-73. DOI:10.1016/j.ejogrb.2018.03.013
6. Brunet BCFK, Shen J, Cai L, et al. Preimplantation genetic testing for complex chromosomal rearrangement carriers by next-generation sequencing. *Reprod Biomed Online.* 2018;37(3):375-82. DOI:10.1016/j.rbmo.2018.07.001

Статья поступила в редакцию / The article received: 21.02.2021

Статья принята к печати / The article approved for publication: 25.10.2021



OMNIDOCTOR.RU