

Преимплантационное генетическое тестирование мукополисахаридоза II типа: клинический случай

Соловьёва Е.В.¹, Минайчева Л.И.¹, Склеймова М.М.¹, Фомин А.О.², Бройтман Е.В.², Бакулина Е.М.³, Зотов С.В.³, Яковлева Ю.С.¹, Жигалина Д.И.¹, Канбекова О.Р.¹, Сеитова Г.Н.¹

- 1 — Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук
634050, г.Томск, Россия, ул. Набережная реки Ушайки, д. 10
- 2 — АО Медицинский Центр «АВИЦЕННА» группы компаний «Мать и Дитя»
630099, г. Новосибирск, Россия, ул. Коммунистическая, д. 17
- 3 — ООО «Витромед»
630008, г. Новосибирск, Россия, ул. Сакко и Ванцетти, д. 77

Цель: представление клинического случая успешного преимплантационного генетического тестирования моногенного заболевания (ПГТ-М) – мукополисахаридоза второго типа (МПС II, синдром Хантера).

Методы. Супружеская пара (32 и 31 год), имеющая ребенка с МПС II, обратилась за проведением ПГТ-М (патогенный вариант гена *IDS* – с.613delG). У женщины также имелась инверсия хромосомы 10. Для семьи была разработана система таргетного преимплантационного тестирования МПС II, валидирована на единичных лимфоцитах и продуктах полногеномной амплификации. Использовали метод двухраундной ПЦР с детекцией фрагментным анализом. В двух программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) применяли стандартные протоколы стимуляции суперовуляции, оплодотворение проводили методом ИКСИ (инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита). Биопсию эмбрионов выполняли на пятые сутки развития (один эмбрион на шестые), эмбрионы витрифицировали. ПГТ-М проводили в транспортном варианте по схеме, разработанной на подготовительном этапе. Пренатальную диагностику выполняли методом хорионбиопсии, анализировали кариотип, ген *IDS* и пол плода.

Результаты. При разработке системы были подобраны и протестированы 14 STR-маркеров (коротких tandemных повторов), сцепленных с геном *IDS*, из которых половина была информативна и давала амплификацию для единичных клеток. Разработанная для семьи система ПГТ-М МПС II включала анализ патогенного варианта гена *IDS*, семи информативных STR-маркеров, генов *AMEL* и *SRY*. Преимплантационное тестирование анеуплоидии не проводилось (пациентка отказалась). В первой программе ЭКО протестировано и рекомендовано к переносу три эмбриона, однако перенос был отложен по желанию супружеской пары. Во второй программе ЭКО пять эмбрионов были протестированы, три рекомендованы к переносу. Проведен криоперенос одного эмбриона мужского пола с нормальной хромосомой X в отношении патогенного варианта гена *IDS*. Наступила одноплодная беременность. Пренатальная диагностика полностью подтвердила результаты ПГТ-М. Беременность успешно завершилась срочными родами здорового мальчика в июле 2021 года.

Заключение Разработанная нами система, успешное проведение всех этапов ЭКО и ПГТ-М и хороший репродуктивный потенциал супружеской пары позволили достичь беременности и рождения здорового ребенка в семье с высоким генетическим риском в отношении МПС II.

Ключевые слова: ПГТ-М, преимплантационное генетическое тестирование моногенных болезней, мукополисахаридоз тип II (МПС II), синдром Хантера, ЭКО, ген *IDS*.

Для цитирования: Соловьёва Е.В., Минайчева Л.И., Склеймова М.М., Фомин А.О., Бройтман Е.В., Бакулина Е.М., Зотов С.В., Яковлева Ю.С., Жигалина Д.И., Канбекова О.Р., Сеитова Г.Н. Преимплантационное генетическое тестирование синдрома Хантера: клинический случай. *Медицинская генетика* 2021; 20(9): 34-44.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.09.34-44

Автор для корреспонденции: Соловьёва Елена Викторовна, e-mail: elena.soloveva@medgenetics.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский центр Российской академии наук).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила: 25.09.2021.

Preimplantation genetic testing for mucopolysaccharidosis type II: a case report

Soloveva E.V.¹, Minaycheva L.I.¹, Skleimova M.M.¹, Fomin A.O.², Broitman E.V.²,
Bakulina E.M.³, Zotov S.V.³, Yakovleva Y.S.¹, Zhigalina D.I.¹, Kanbekova O.R.¹, Seitova G.N.¹

1 — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences
10 Naberejnaya Ushaiki, Tomsk, 634050, Russian Federation

2 — Medical Center «AVICENNA» JSC of the group of companies «Mother and Child»
17 Kommunisticheskaya st., Novosibirsk, 630099, Russian Federation

3 — Vitromed LLC
77 Sakko i Vancetti st., Novosibirsk, 630008, Russian Federation

Aim: we report of our data of successful preimplantation genetic testing (PGT-M) for mucopolysaccharidosis type II (MPS II, Hunter syndrome).

Methods. A couple (32 and 31 years old) with Hunter syndrome affected child asked for PGT-M for MPS II (pathogenic variant c.613delG of the *IDS* gene). In addition, the woman has an inversion of chromosome 10. A system of targeted preimplantation testing was developed for the family, validated on single lymphocytes and whole genome amplification products. Nested PCR method and fragmentary analysis were used for molecular genetic studies. Two IVF (*in vitro* fertilization) programs was carried out. Standard protocols for controlled ovarian hyperstimulation with fertilization by ICSI (intracytoplasmic sperm injection) were used. Embryo biopsy was performed on the 5th day of embryo development (day 6th for one embryo), embryos were vitrified. Transport PGT-M (PGT for monogenic/single gene defects) was carried using system created at pre-examination setup. Prenatal diagnosis was performed using the chorion villus biopsy method; karyotype, *IDS* gene and fetal sex were analyzed.

Results. During setup, 14 STR (short tandem repeat) markers linked to the *IDS* gene were selected and tested, half of them were informative and acceptable for single cells. Developed for the family the PGT-M MPS II system included analysis of a pathogenic variant of the *IDS* gene, seven informative STR markers, *AMEL* and *SRY* genes. No PGT-A (PGT for aneuploidy) was carried out. In the first IVF program, three embryos were tested and recommended for transfer, but the transfer was postponed at the patient request. In the second IVF program, five embryos were tested, three recommended for transfer. Frozen single embryo transfer of normal male embryo at the second of IVF-PGT-M program was carried out. A singleton pregnancy was achieved. Prenatal diagnosis fully confirmed PGT-M results. A healthy boy was delivered in July 2021.

Conclusions. The successful implementation IVF-PGT-M with developed system and good reproductive potential of the couple made it possible to achieve pregnancy and the birth of a healthy child in a family with a high genetic risk for MPS II.

Keywords: PGT-M, Preimplantation testing for monogenic/single gene defects, Mucopolysaccharidosis type II (MPS II), Hunter syndrome, *IDS* gene.

For citation: Soloveva E.V., Minaycheva L.I., Skleimova M.M., Fomin A.O., Broitman E.V., Bakulina E.M., Zotov S.V., Yakovleva Y.S., Zhigalina D.I., Kanbekova O.R., Seitova G.N. Preimplantation genetic testing for mucopolysaccharidosis type II: a case report. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2021; 20(9): 34-44. (In Russ.)

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.09.34-44

Corresponding author: Elena V. Soloveva, e-mail: elena.soloveva@medgenetics.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for Research Institute of Medical Genetics Tomsk National Research Medical Center Russian Academy of Sciences.

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

Accepted: 25.09.2021.

Введение

Мукополисахаридоз второго типа (МПС II) или синдром Хантера — тяжелое прогрессирующее мультисистемное наследственное заболевание, причиной которого является генетически обусловленный дефицит фермента идуронат-2-сульфатазы (*IDS*). МПС II наследуется по X-сцепленному рецессивному типу и проявляется у лиц мужского пола [1]. Описано несколько случаев МПС II у женщин, что связывают со смещением инактивации X-хромосомы, либо хромосомными перестройками [1–4]. Заболевание относится к редким, его частота составляет 0,38–1,09 на 100 тыс. новорожденных [1].

МПС II изучается уже более ста лет. Впервые болезнь описана Чарльзом Хантером в 1917 году. Из метаболического нарушения с неизвестной этиологией к настоящему времени болезнь стала относительно хорошо изученной, разработаны методы диагностики и лечения [1]. Заболевание относится к лизосомным болезням накопления, его патогенез включает нарушение катаболизма в лизосомах таких гликозаминогликанов (мукополисахаридов), как гепарансульфат и дерматансульфат, и их накопление во многих органах и тканях. Клинические симптомы у пациентов с МПС II начинают проявляться, преимущественно,

в возрасте 2–4 лет. В дальнейшем они неуклонно прогрессируют и включают скелетные деформации, тяжелую обструкцию дыхательных путей, кардиомиопатию, гепатоспленомегалию, задержку развития и неврологические нарушения. Выделяют тяжелую форму МПС II с ранним началом, составляющую 60% случаев, и более мягкую [2]. Продолжительность жизни при тяжелой форме ограничена 20 годами.

Ген *IDS*, кодирующий фермент, локализован в регионе Xq28. Генетическая гетерогенность заболевания достаточно высока. Известно свыше 650 патогенных вариантов, являющихся причиной МПС II, в большинстве случаев представленных однонуклеотидными заменами и делециями [1, 2, 4]. Ввиду отсутствия частых мутаций и орфанного характера заболевания, данные о генотип-фенотипических корреляциях ограничены. Ген *IDS* относят к так называемым «генам домашнего хозяйства», и его нарушения ведут к мультисистемному характеру патологии. На расстоянии 3,9 т.п.н. от гена расположен псевдоген *IDSPI*, гомологию которого с геном *IDS*, в частности по экзонам 2 и 3, необходимо учитывать при молекулярно-генетических исследованиях МПС II [1].

К настоящему времени достигнуты большие успехи в лечении заболевания, особенно в области ферментозаместительной терапии [1]. Тем не менее, лечение не может быть признано оптимальным, в том числе, ввиду крайне высокой стоимости препаратов рекомбинантной идуронат-2-сульфатазы.

Диагностика заболевания обычно проводится при появлении клинических симптомов у ребенка и включает анализ гликозаминогликанов в моче или плазме крови с последующим анализом энзиматической активности *IDS* в клетках крови, плазме или сыворотке крови. Определение активности фермента *IDS* считают золотым стандартом диагностики МПС II [2]. Молекулярно-генетический анализ используется, преимущественно, для подтверждения биохимических данных и выявления патогенной мутации [2]. Ранняя диагностика для данного заболевания очень важна. В пилотных исследованиях проводится неонатальный скрининг на лизосомные болезни [1]. В настоящее время носительство патогенных и вероятно патогенных вариантов гена *IDS* может выявиться и при планировании беременности с обследованием на широких, полногеномных панелях тестирования. При этом консультирование в отношении дородовой диагностики может осложняться ограничениями данных о генотип-фенотипических корреляциях.

Пренатальная диагностика основана на определении активности фермента в образцах ворсин хориона, клетках амниотической жидкости и молекулярно-ге-

нетической диагностике вотягощенных семьях. Преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) — относительно новый метод дородовой диагностики, способный выявить эмбрион с аномальным генотипом в лечебном цикле ЭКО (экстракорпорального оплодотворения) до имплантации. ПГТ выполняется на материале, представляющем собой единичные клетки (от одной до десяти клеток), поэтому преимплантационное выявление моногенного заболевания (ПГТ-М) возможно исключительно молекулярно-генетическими методами.

В литературе представлено несколько описаний клинических случаев ПГТ МПС II [5-7]. Одни из первых данных об успешном проведении преимплантационной диагностики синдрома Хантера приводятся в книге Y.Verlinsky и A. Kuliev (2005) в разделе, посвященном X-сцепленным заболеваниям [5]. В работе G. Altarescu с соавт. (2011) детально описаны три случая ПГТ МПС II. Преимплантационное тестирование выполнялось по полярным тельцам и бластомерам стадии дробления. [6]. В работе D.S. Ко с соавт. (2019) описан первый клинический случай ПГТ МПС II в Корее. Анализ выполнялся по двум бластомерам от каждого эмбриона 3-го дня развития [7].

Во всех описанных выше клинических случаях применялся метод ПЦР с анализом мутации (патогенного варианта) и сцепленных полиморфных маркеров. Такой подход в настоящее время получил название таргетного [8]. Полногеномные технологии ПГТ, активно развивающиеся в настоящее время для выявления хромосомной патологии, пока имеют ограничения в отношении моногенных болезней.

Целью настоящего исследования явилось описание клинического случая успешного проведения ЭКО с ПГТ МПС II.

Методы исследования

Супружеская пара (пациентка, 32 года и супруг, 31 год) из г. Новосибирска обратились в Медико-генетический центр (Генетическую клинику) НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ в июле 2019 года для планирования беременности с применением ПГТ-М. В семье есть ребенок с МПС II (7 лет) от первого брака пациентки. Диагноз поставлен в возрасте 3-х лет, была начата ферментозаместительная терапия. Течение заболевания тяжелое: дважды проведено оперативное вмешательство по поводу контрактур суставов (пальцев рук, локтевых суставов, левой ступни). Ребенок учится в коррекционной школе, отмечаются дефицит внимания, нарушения поведения; наблюдается у психиатра (когнитивные нарушения). Диагноз подтвержден молекулярно-генетиче-

ски. У ребенка патогенный вариант с.613delG в экзоне 5 гена *IDS* в гемизиготном состоянии был обнаружен методом прямого секвенирования экзонов гена (Медико-генетический научный центр, г. Москва). У пациентки при секвенировании экзона 5 гена *IDS* патогенных вариантов в образце ДНК из клеток крови не было выявлено. В дальнейшем, вариант с.613delG, приводящий к сдвигу рамки считывания A205Pfs*8, был найден в гетерозиготном состоянии в ДНК, выделенной из буккального эпителия (Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, г. Москва). По результатам стандартного цитогенетического обследования, предоставленного супругами, у пациентки была выявлена перичентрическая инверсия хромосомы 10 материнского происхождения (46,XX,inv(10)(p11.2q21.1); у супруга аномалий кариотипа не выявлено (АНО «Региональный центр высоких медицинских технологий», г. Новосибирск).

Супружеской паре проведено несколько этапов медико-генетического консультирования: при планировании ПГТ-М, по итогам подготовительного этапа, претестовое и послетестовое при ПГТ-М и при последующей пренатальной диагностике. На все процедуры было получено добровольное информированное согласие.

Для планирования ПГТ-М проводили подготовительный этап с разработкой новой тест-системы прямого анализа патогенного варианта с.613delG гена *IDS* (chrX(GRCh37)g:148579733del; NM_00022.5; с.613delG p.A205Pfs*8) в сочетании с косвенной диагностикой по полиморфным STR-маркерам (short tandem repeat) и анализом генетических маркеров пола *AMEL* и *SRY* методом двухраундной ПЦР. Для поиска необходимых последовательностей ДНК использовали электронный ресурс «UCSC genome browser» [9].

Биологическим материалом для подготовительного этапа являлись образцы венозной крови пациентки, супруга, ребенка и добровольного донора (для тестовой ДНК и единичных лимфоцитов), забранные в пробирки-вакутейнеры с ЭДТА. У пациентки дополнительно были забраны образцы буккального эпителия на стерильную ватную палочку. Для выделения ДНК из образцов крови, буккального эпителия и в дальнейшем ворсин хориона использовали набор «ДНК сорб Б» (Амплисенс, Россия). Для выделения единичных лимфоцитов сначала получали взвесь мононуклеаров центрифугированием крови в градиенте плотности раствора фиколла. Единичные лимфоциты выделяли стеклянной микропипеткой под микроскопом и помещали в микропробирки с лизирующим раствором, содержащим протеиназу К, тритон X-100 и твин 20 [10]. Для валидации системы дополнительно

применяли тестовые продукты полногеномной амплификации (ПГА) фрагментов трофэктодермы, ПГА проводилась с использованием технологии множественного замещения цепи (MDA) с применением набора «GenetiSure PreScreen Complete kit with MDA WGA» (Agilent Technologies).

Молекулярно-генетические исследования проводили с использованием ПЦР с флуоресцентно-меченными олигонуклеотидными праймерами. Условия и программы амплификации применяли согласно рекомендациям, изложенным в атласе по преимплантационной диагностике Y.Verlinsky и A.Kuliev (2005) [10]. При амплификации на единичных клетках применяли двухраундную ПЦР. В первом раунде (ПЦР1) проводили мультиплексную амплификацию всех тестируемых локусов; во втором (ПЦР2) каждый локус амплифицировали индивидуально. Использовали стандартную Taq-полимеразу в ПЦР1 и Hot Start Taq-полимеразу в ПЦР2 (СибЭнзим, Россия). Детекцию проводили методами полиакриламидного гель-электрофореза (7%, буфер TBE) для первоначальной оценки амплификации и капиллярного гель-электрофореза на генетическом анализаторе «3130xl» (Applied Biosystems) или «Нанофор 05» (Синтол, Россия). Во всех сериях амплификации использовали отрицательные и положительные контроли.

На подготовительном этапе после дизайна тест-системы все пары олигонуклеотидных праймеров проверяли амплификацией на тестовой ДНК, затем выполняли анализ патогенного варианта с.613delG гена *IDS*, STR-маркеров на образцах семьи. Далее, в соответствии с международными рекомендациями по ПГТ-М [8], всю систему анализа, включающую патогенный генетический вариант, информативные ДНК-маркеры, гены *AMEL* и *SRY* валидировали на модельных единичных клетках – неродственных единичных лимфоцитах (N=28) и продуктах ПГА (N=4).

Супружеская пара прошла две программы ЭКО с ПГТ-М в 2020 году в двух разных репродуктивных центрах г. Новосибирска. В обоих случаях пациентка и супруг прошли стандартное обследование перед ЭКО [11]. Анализ эякулята выполнялся в соответствии с рекомендациями ВОЗ [12]. Контролируемую стимуляцию суперовуляции проводили по стандартным протоколам с использованием рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (рФСГ). В обоих случаях были использованы протоколы с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ). Вторая программа включала комбинацию рФСГ и рекомбинантного лютеинизирующего гормона. Триггер овуляции – хорионический гонадотропин человека вводили за 35 часов до пункции фолликулов.

Оплодотворение проводилось методом ИКСИ (инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита). Эмбриологические процедуры и биопсию эмбрионов выполняли с учетом отечественных и международных рекомендаций [11, 13]. Для культивирования эмбрионов применяли одношаговые среды «Continuous Single Culture Complete» в первой программе и «Continuous Single Culture» во второй (Fujifilm Irvine Scientific, США). Биопсию эмбрионов хорошего качества выполняли на 5-е сутки развития (одного из эмбрионов в первом цикле на 6-е сутки) методом «флип» (механическое обрывание части трофэктодермы с помощью плотной стыковки удерживающей и биопсийной игл). Полученные фрагменты трофэктодермы помещали в лизирующий раствор, аналогичный указанному выше для единичных лимфоцитов, и замораживали. Сразу после процедуры биопсии эмбрионы криоконсервировали методом витрификации с использованием сред и носителей Kitazato (Kitazato Corporation, Dibimed-Biomedical Supply, Испания) в первой программе и Fujifilm Irvine Scientific (США) во второй. ПГТ-М выполняли по транспортной схеме в г. Томске методом двухраундной ПЦР по схеме, разработанной на подготовительном этапе.

Подготовка к криопереносу эмбриона проводилась в естественном цикле. Перенос размороженного эмбриона из второй программы ЭКО-ИКСИ-ПГТ выполнен в ноябре 2020 года с учетом результатов ПГТ-М. Применяли среды для размораживания Kitazato, катетер для переноса Labotect (190 мм). Диагностика беременности выполнялась стандартно методом ультразвукового исследования.

В январе 2021 года пациентке проведена инвазивная пренатальная диагностика. Материал плода забирала методом хорионбиопсии под контролем УЗИ. Кариотип плода исследовали микроскопически на прямых препаратах ворсин хориона с дифференциальным GTG-окрашиванием. Молекулярно-генетическое исследование ДНК образца из ворсин хориона проводили с анализом всех локусов, протестированных при ПГТ-М.

Исследование было проведено с использованием ресурсов биобанка «Биобанк населения Северной Евразии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ и оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

Результаты

В ходе медико-генетического консультирования семьи вероятность выявления эмбриона с аномальным генотипом в отношении синдрома Хантера оценивалась как стандартный генетический риск для X-сцеп-

ленного заболевания — 50% для эмбрионов мужского пола. Однако с учетом предоставленных пациенткой разных результатов выявления патогенного варианта по крови и буккальному эпителию первоначально не исключался тканевой мозаицизм у матери. В ходе нашей работы патогенный вариант гена *IDS*, представляющий собой однонуклеотидную делецию, удалось хорошо детектировать методом фрагментного анализа. После тестирования семьи обнаружено, что данный патогенный вариант в гетерозиготном состоянии присутствует как в образце крови пациентки, так и буккального эпителия, а также подтверждается у ребенка в гемизиготном состоянии, соответственно. Поэтому дальнейшее планирование ПГТ-М осуществляла, подразумевая сцепленное с полом наследование.

Медико-генетическое консультирование супружеской пары включало оценку возможного риска хромосомной патологии. С учетом инверсии хромосомы 10 в кариотипе пациентки было рекомендовано сочетание ПГТ-М с анализом хромосомных нарушений в эмбрионах — ПГТ-А. Как альтернатива для профилактики хромосомной патологии рассматривалась пренатальная диагностика. Выполнение ПГТ-А было возможно в НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Семья от проведения ПГТ-А отказалась, приняв решение ориентироваться в дальнейшем на пренатальную диагностику.

Для косвенной диагностики заболевания было подобрано и проанализировано 14 внегенных STR-маркеров в локусе Xq28, фланкирующих ген *IDS* на расстоянии в пределах 1 млн п.н. от патогенного варианта. STR выбирались, преимущественно, из числа ди-нуклеотидных повторов (с гетерозиготностью не ниже 0,8), также включались три- и гексануклеотидные повторы (гетерозиготность не ниже 0,6–0,7). Амплификация на тестовой ДНК показала приемлемые результаты для всех пар праймеров (наличие фрагментов нужного размера, достаточная интенсивность фрагментов для детекции, минимум неспецифических продуктов, отсутствие контаминации). При анализе образцов семьи полиморфизм всех маркеров подтвердился, однако 6 из 14 (42,8%) были гомозиготны и, соответственно, не информативны в отношении мутантной хромосомы пациентки. На рис. 1 представлены гаплотипы семьи по информативным STR-маркерам. В схему родословной также включены данные по ребенку, рожденному с применением ПГТ-М.

При валидации системы на единичных клетках и продуктах ПГА мутация выявлялась хорошо и надежно во всех образцах. Один из восьми информативных STR показал очень слабую амплификацию и представлялся недостаточно надежным для единичных клеток.

В целом необходимое количество локусов для надежной косвенной диагностики на материале эмбрионов было получено.

Планирование ЭКО для супружеской пары было на некоторое время отложено из-за новой коронавирусной инфекции COVID19. Поскольку семья не желала надолго откладывать планирование беременности, то, как только стало возможно, супруги прошли лечение в платной программе ЭКО. Стимуляция суперовуляции прошла стандартно, без осложнений: полных дней стимуляции девять, стартовая доза 200 МЕ, суммарная доза гонадотропинов составила 1550 МЕ. По итогам стимуляции суперовуляции и пункции 7 фолликулов было получено 5 зрелых яйцеклеток. Спермограмма супруга характеризовалась нормозооспермией (объем эякулята 4,7 мл, концентрация сперматозоидов 73 млн/мл, 49% прогрессивно-подвижных). После ИКСИ произошло оплодотворение всех зрелых яйцеклеток (100%). В таблице 1 представлены результаты первого и последующего лечебных циклов ЭКО с ПГТ-М для супружеской пары.

В первой программе ЭКО на пятые-шестые сутки развития эмбрионов, из четырех зигот развились три бластоцисты, пригодные к проведению биопсии трофэктодермы. Как видно из таблицы в первой программе ЭКО-ИКСИ с ПГТ-М все три эмбриона были успешно протестированы. ПГТ-А не проводилась по желанию пациентки. В связи с этим ПГА также не проводилась. В первом эмбрионе выявлен материнский нормальный гаплотип по исследованному локусу хромосомы X; мужской пол подтвердился анализом генов *AMEL* и *SRY*. У двух эмбрионов определен женский пол и, наряду с отцовским гаплотипом, выявлены нормальный материнский у одного эмбриона и патологический – у второго. Соответственно, оба эмбриона женского пола, как норма, так и носитель были также рекомендованы к переносу в полость матки.

Перенос эмбрионов по итогам первого лечебного цикла ЭКО с ПГТ-М не проводился до настоящего времени по желанию пациентки. Криоконсервированные эмбрионы продолжают храниться в репродуктивном центре. Семья приняла решение отложить пере-

STR / Ген	Mb	Hz
1 AC	0,88	0,82
2 AC	0,70	0,84
3 AC	0,56	0,81
4 AC	0,27	0,82
5 AGAT	0,21	0,82
6 AC	0,20	0,88
7 AC	0,09	0,83
IDS Экзон 5		
8 AT	0,14	0,86
9 ACATAT	0,19	0,60
10 AAT	0,70	0,75
11 AAAG	0,82	0,62
12 AC	0,87	0,76
13 AC	0,93	0,78
14 AG	1,14	0,88

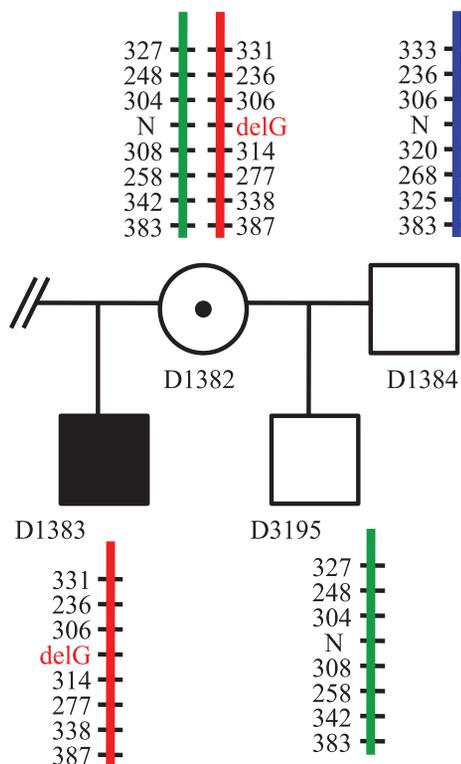


Рис. 1. Родословная и гаплотипы семьи по информативным STR-маркерам, включая ребенка, рожденного с применением ПГТ МПС II (D3195). Патогенный вариант гена *IDS* delG=c.613delG. Слева в таблице перечень исследованных STR-маркеров; серая заливка – не информативные маркеры, а также STR №8, показавший плохую амплификацию на единичных клетках; Mb – расстояние от патогенного варианта гена *IDS* (млн п.н.), Hz – гетерозиготность.

нос с тем, чтобы дождаться программы ЭКО за счет средств ОМС.

Во втором лечебном цикле ЭКО-ИКСИ с ПГТ-М стимуляция суперовуляции также прошла без осложнений: полных дней стимуляции десять, стартовая доза 225 МЕ, суммарная доза гонадотропинов составила 3600 МЕ. Показатели эякулята в день оплодотворения составили: объем 5,4 мл, концентрация 74 млн/мл, прогрессивно-подвижных сперматозоидов 43%. Из шести зрелых яйцеклеток, полученных в результате пункции десяти фолликулов все 6 (100%) оплодотворились после ИКСИ (табл. 1). Все шесть эмбрионов достигли стадии бластоцисты, пять из них были успешно пробиопсированы. Шестой эмбрион криоконсервирован без биопсии (решение пациентки). Все пять эмбрионов (100%) были успешно протестированы. Для тестирования была использована та же система, и каких-либо противоречащих данных по распределению гаплотипов не было получено. Два эмбриона мужского пола были определены как гемизиготы по мутации. Три эмбриона были рекомендованы к переносу в полость матки. ПГТ-А и, соответственно, ПГА во втором лечебном цикле также не проводилась. На рис. 2 представлены результаты фрагментного анализа патогенного варианта с.613delG гена *IDS*, полученные в ходе ПГТ-М во второй программе ЭКО. Подобным образом анализировались и все STR-маркеры.

В обоих циклах для патогенного варианта и всех информативных локусов была получена ампли-

фикация в 100% для всех образцов. Только один из STR-локусов, который вызвал сомнение на подготовительном этапе был но тем не менее был включен в исследование, показал плохую амплификацию в образцах эмбрионов и был исключен из анализа результатов. Явление выпадения аллеля или преимущественная амплификация аллеля (ADO – allele dropout) в данном клиническом случае не отмечались ни для одного локуса (0%).

Во второй программе ЭКО-ИКСИ-ПГТ-М был проведен перенос размороженного эмбриона с нормальным генотипом мужского пола по данным ПГТ-М. В дальнейшем УЗИ показало, что эмбрион имплантировался и развивается одноплодная беременность.

На сроке 12 недель беременности пациентка обратилась за пренатальной диагностикой. При проведении УЗИ мужской пол не был виден. Цитогенетическое исследование ворсин хориона позволило установить нормальный кариотип плода – 46,XY. Присутствие инверсии хромосомы 10 нельзя было исключить однозначно, и было дано заключение о варианте нормы с рекомендацией дополнительного постнатального кариотипирования. По результатам ДНК-диагностики определены мужской пол плода, нормальный генотип эмбриона в отношении патогенного варианта гена *IDS*, нормальный гаплотип по косвенным маркерам. Эти результаты полностью подтвердили результаты преимплантационного тестирования эмбриона, который был выбран для переноса.

Таблица 1

Результаты преимплантационной диагностики МПС II

Программа ЭКО/ИКСИ с ПГТ-М	N					Результат по генотипу и полу эмбрионов	Реком.	Перенос эмбр. / Берем.
	Фол./МП	2PN	VL/ Биоп.	Тест.	Норм/Аном.			
1	7/5	5	4/3	3/3	3/0	1) Норма, м	Рек.	
						2) Норма, ж	Рек.	
						3) Носитель, ж	Рек.	
2	10/6	6	6/5	5/5	3/2	1) Норма, м	Рек.	ПЭ/Пол.
						2) Носитель, ж	Рек.	
						3) Гемизигота, м	НЕТ	
						4) Гемизигота, м	НЕТ	
						5) Носитель, ж	Рек.	

Примечание: Фол./МП – число пунктированных фолликулов / число зрелых яйцеклеток; 2PN – число нормальных, двух-пронуклеарных зигот; VL/Биоп. – число бластоцист 5-х суток развития / число биопсированных эмбрионов; Тест. – число направленных на тестирование образцов / число успешно протестированных; Норм/Аном. – число эмбрионов, генотип которых определен как нормальный / число эмбрионов с аномальным генотипом; Реком. – рекомендации для переноса эмбрионов в полость матки: Рек. – рекомендован, НЕТ – не рекомендован. Перенос эмбр. / Берем. – Проведен перенос эмбриона в полость матки (ПЭ) / Пол. – положительный результат наступления беременности.

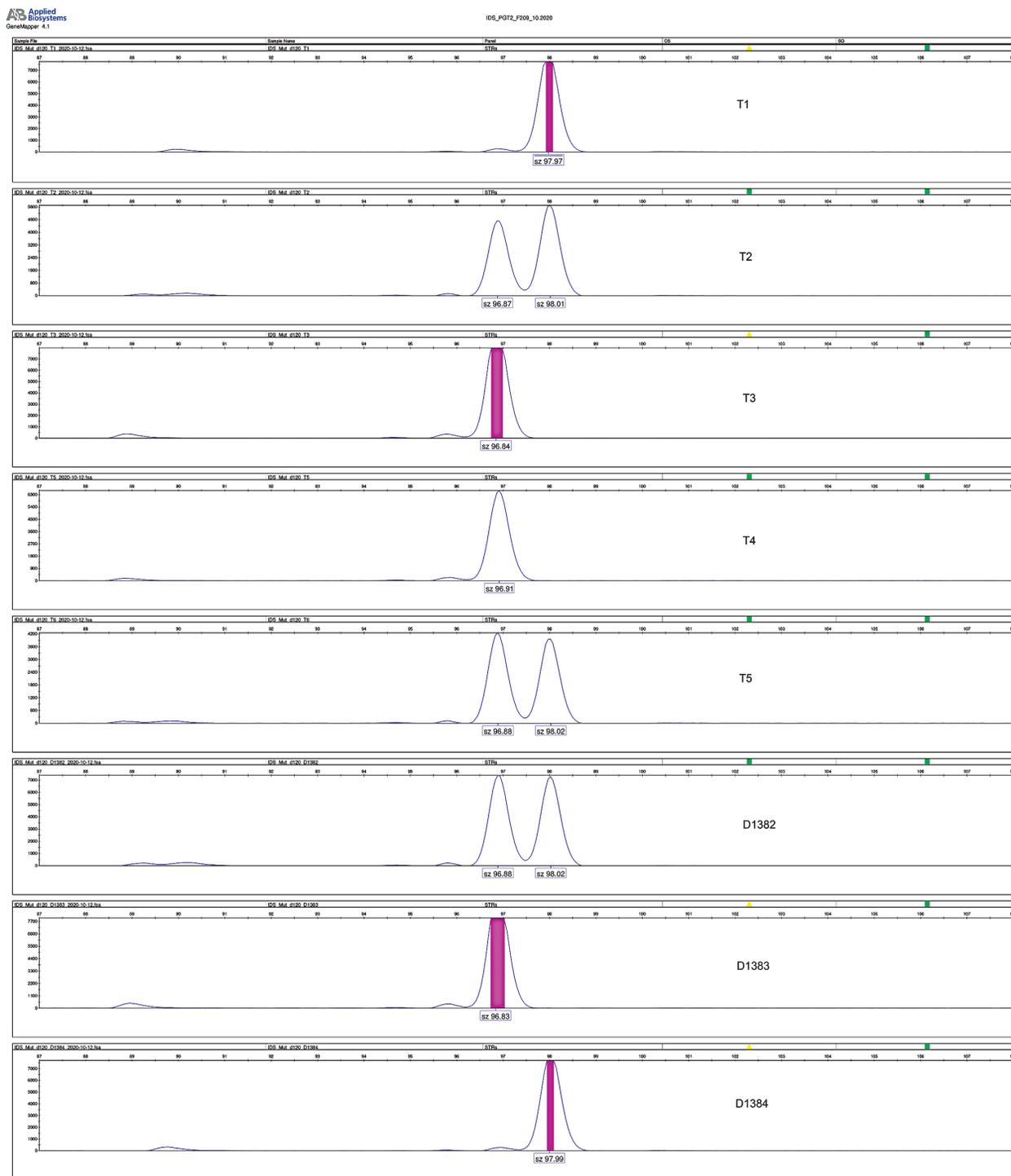


Рис. 2. Результат фрагментного анализа патогенного варианта с.613delG гена *IDS*, из ПГТ-М МПС II второй программы ЭКО: T1-T5 – образцы трофобластической ткани эмбрионов, D1382-D1384 – контрольные образцы семьи (пациентка, ребенок с МПС II и супруг); нормальный аллель соответствует фрагменту 98 п.н. (в округлении), мутантный – 97 п.н.

Беременность завершилась в июле 2021 года срочными самостоятельными родами (срок гестации 37 недель) здорового мальчика: длина тела 53 см, масса тела 3600 г (оценка по шкале Апгар 7/8 баллов).

Обсуждение

В нашем исследовании представлен клинический случай ПГТ МПС II с разработкой новой системы ПГТ-М, проведением двух лечебных циклов ЭКО с ПГТ-М, пренатальной диагностикой. Исходом явилось рождение здорового мальчика. Известно, что заболевание проявляется не сразу при рождении, однако уверенность в том, что у ребенка заболевание не может развиться, основана на том, что в генотипе эмбриона и плода не выявлен патогенный вариант, а гаплотип в исследованном локусе Xq28 отличается от большого сибса.

В семье уже есть ребенок с тяжелой формой заболевания, поэтому вопросы проявления заболевания супругам были хорошо известны. Применение пренатальной диагностики при самостоятельно наступившей беременности, как альтернатива ПГТ-М, в ходе медико-генетического консультирования рассматривалось. В то же время, возраст женщины, как и при самостоятельной беременности имеет определенные риски для результатов ЭКО. Негативный опыт прерывания беременности по результатам пренатальной диагностики может отложить дальнейшее планирование ЭКО с ПГТ-М, и в этом случае влияние данного фактора может стать уже существенным. Так, D.S. Ко с соавт. приводят клинический случай ПГТ МПС II у супружеской пары, которая перед этим столкнулась с негативным опытом прерывания беременности по итогам пренатальной диагностики [7].

В представленном нами клиническом случае беременность была достигнута с первой попытки переноса тестированного эмбриона. Перенос проводили только во второй программе ЭКО с ПГТ-М; в первой перенос отложили по желанию пациентки, что является нестандартной ситуацией. Причиной послужила возможность пройти лечение за счет средств ОМС. В результате получился своеобразный накопительный вариант ЭКО. Эмбрионы хорошего качества были получены как в первой, так и во второй программе. Супружеская пара имела хороший репродуктивный потенциал, достаточное число фолликулов в ответ на стимуляцию, показатели эякулята супруга в норме, хороший процент оплодотворения. Супруги планируют через определенное время пройти следующую процедуру переноса эмбриона.

Известно, что в целом ЭКО имеет ограниченные шансы на успех, даже у фертильных супружеских пар. Так, в описании трех клинических случаев ПГТ МПС II в статье G. Altarescu с соавт. только у одной из супружеских пар удалось достичь беременности в первой попытке ЭКО с ПГТ. В другой семье – с четвертой попытке ЭКО с тем, что в предыдущих попытках не было имплантации, либо эмбрионов, пригодных для переноса по результатам тестирования. В третьей семье успешная беременность и рождение здорового ребенка произошли в результате шестого лечебного цикла (неудачи имплантации и спонтанное прерывание беременности в предыдущих попытках) [6].

На этапе разработки системы мы обнаружили расхождение результатов наших исследований патогенного варианта гена *IDS* и представленных пациенткой. В нашем исследовании мы не выявили различия генотипов в образцах крови и буккального эпителия пациентки и причины расхождения с другой лабораторией остались не ясны. Мы интерпретировали наследование как классическое X-сцепленное рецессивное с вероятностью проявления заболевания 50% у лиц мужского пола. Молекулярно-генетический анализ гена *IDS* осложнен близостью псевдогена, гомологичного по ряду областей гену. Но это в меньшей степени должно затрагивать экзон 5, в котором расположен семейный патогенный вариант.

Альтернативой ПГТ-М для X-сцепленных заболеваний, к которым относится МПС II, служит преимплантационный выбор пола эмбриона по медицинским показаниям. В этом случае делается выбор в пользу эмбрионов женского пола, поскольку они могут быть либо носителями, либо нормой. ПГТ в этом случае может быть выполнено без подготовительного этапа и разработки системы. Однако такой подход недостаточно оптимален с современной точки зрения, поскольку отбор будет происходить против всех эмбрионов мужского пола. Это вызывает критику с этической точки зрения. Кроме того, число эмбрионов, которые можно получить в программах ЭКО у человека, ограничено.

Для данного клинического случая нами была разработана новая система тестирования семейной однонуклеотидной делеции в сочетании с косвенной диагностикой мутантной хромосомы по STR-маркерам для целей ПГТ-М. Использование сочетания прямой и косвенной ДНК-диагностики позволяет существенно повысить точность ПГТ-М, которая проводится на малом количестве генетического материала. Такой подход используется в мировой практике, готовых коммерческих продуктов для такого тестирования пока нет.

В нашем исследовании мы однозначно определили генотип, гаплотипы и пол всех эмбрионов. По всем

эмбрионам были даны рекомендации к переносу в полость матки. В нашем случае мы тестировали образцы трофэктодермы эмбрионов пятого дня развития, что на сегодняшний день является стандартным вариантом биоматериала для ПГТ. Качество образцов всех исследованных 8 эмбрионов, о котором можно судить по качеству амплификации, было очень хорошим. Все определенные нами гаплотипы были родственны пациентке и супругу. Показатели эффективности амплификации были достаточно высоки и явления ADO в данном нашем случае не было. В описанных в литературе случаях ПГТ выполнялось на blastomeres стадии дробления, либо полярных тельцах [5-7].

При проведении ПГТ МПС II мы использовали относительно большое число маркеров. Применение косвенной диагностики наряду с прямым анализом мутации особенно критично при анализе единичных клеток, таких как полярные тельца или единичные blastomeres стадии дробления. Трофэктодерма эмбриона представляется менее экстремальным вариантом преимплантационного биоматериала, особенно, если подвергается предварительной ПГА. В проведенных ранее исследованиях мы получали достаточно хорошие результаты амплификации фрагментов трофэктодермы эмбрионов пятых суток развития как с использованием ПГА, так и без [14]. Можно предположить, что критерии косвенной диагностики должны различаться для истинно единичных клеток, для которых риск ADO крайне высок, и нескольких клеток, где риск ADO, во всей видимости, ниже. Однако в текущих международных рекомендациях разницы между биоматериалом преимплантационных эмбрионов в отношении объемов косвенной диагностики не делается [8]. Так или иначе, наша система молекулярно-генетического тестирования показала высокую степень надежности на материале эмбрионов из двух программ ЭКО разных клиник. В описанном D.S. Ко с соавт. клиническом случае для одного из 14 эмбрионов не удалось сделать заключение по генотипу в связи с ADO для части STR маркеров, а также полуинформативностью части ДНК-маркеров [7].

Разработанная нами система была валидирована не только на единичных клетках, но и на ПГА-продуктах. ПГА позволяет объединить таргетные и полногеномные технологии, обеспечивает стандартизацию первых этапов молекулярно-генетического исследования, а также дает возможность сочетать ПГТ-М с ПГТ-А. В настоящее время ПГТ-А широко применяется при ЭКО в связи с возможностью предотвратить хромосомную патологию у эмбриона и плода, а также потенциальной возможностью улучшить исходы ЭКО, избегая переноса аномальных по хромосомному ста-

тусу эмбрионов. В то же время, не все международные рекомендации однозначно рекомендуют применять ПГТ-А. Так, Американское Общество Репродуктивной Медицины (ASRM, American Society for Reproductive Medicine) рекомендует с осторожностью консультировать пациентов в отношении ПГТ-А, приводя данные, не поддерживающие представления о преимуществах ПГТ-А [15]. В нашем случае применялись принципы недирективного консультирования, в том числе в отношении ПГТ-А.

Несмотря на повышенный риск хромосомной патологии в связи с инверсией хромосомы 10 и рекомендациями супругам к проведению ПГТ-А, пациентка от ПГТ-А отказалась в обеих программах ЭКО. Пациентка приняла решение опираться на пренатальную диагностику в вопросе снижения риска хромосомной патологии. Хорионбиопсия является более ранним вариантом пренатальной диагностики, однако препараты метафазных клеток, получаемые из ворсин хориона, не всегда оптимальны для выявления мелких структурных хромосомных перестроек. Так, в нашем случае невозможно было сделать однозначного заключения о присутствии материнской инверсии хромосомы 10. В целом кариотип был интерпретирован как норма. Была дана рекомендация по постнатальному кариотипированию.

Таким образом, все факторы – тщательно проработанная система молекулярно-генетического исследования единичных клеток, эффективно проведенные этапы программы ЭКО, генетического консультирования и пренатальной диагностики, хороший репродуктивный потенциал супружеской пары позволили добиться основного результата – рождения здорового ребенка в семье с высоким генетическим риском в отношении МПС II.

Литература

1. D'Avanzo F., Rigon L., Zanetti A., Tomanin R. Mucopolysaccharidosis Type II: One Hundred Years of Research, Diagnosis, and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1258; doi:10.3390/ijms21041258.
2. Hashmi M.S., Gupta V. Mucopolysaccharidosis Type II NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560829/>
3. Zhang C., Hao S., Meng Z. et al. Detailed pedigree analyses and prenatal diagnosis for a family with mucopolysaccharidosis type II *BMC Med Genomics.* 2021;14:175. <https://doi.org/10.1186/s12920-021-01027-5>
4. Semyachkina A.N., Voskoboeva E.Y., Nikolaeva E.A., Zakharova E.Y. Analysis of long-term observations of the large group of Russian patients with Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II). *BMC Med Genomics.* 2021;14:71. <https://doi.org/10.1186/s12920-021-00922-1>
5. Verlinsky Y., Kuliev A. *Practical Preimplantation Genetic Diagnosis.* Springer. 2005:198.

6. Altarescu G., Renbaum P., Eldar-Geva T. et al. Preventing mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): PGD and establishing a Hunter (46, XX) stem cell line. *Prenat Diagn.* 2011;31:853-60. doi: 10.1002/pd.2786
7. Ko D.S., Lee S.H., Park C.W., Lim C.K. Birth of a healthy baby after preimplantation genetic diagnosis in a carrier of mucopolysaccharidosis type II: The first case in Korea. *Clin Exp Reprod Med.* 2019;46(4):206-210. <https://doi.org/10.5653/cerm.2019.00094>
8. ESHRE PGT-M Working Group, Carvalho F., Moutou C., et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders *Human Reproduction Open.* 2020:1–18. doi:10.1093/hropen/hoaa018
9. UCSC genome browser. <https://genome.ucsc.edu/index.html>
10. Verlinsky Y., Kuliev A. *Atlas of Preimplantation Genetic Diagnosis. Second edition.* 2005. Taylor & Francis: 281.
11. Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация. Клинические рекомендации (протокол лечения). МЗ РФ 05 марта 2019 года № 15-4/н/2-1908. 169 с. http://www.rahr.ru/pech_mat_norm.php
12. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Пятое издание (2010). Капитал принт. 2012:291.
13. ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology BiopsyWorking Group, Kokkali G, Coticchio G. et al. ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT. *Human Reproduction Open.* 2020:1-12. doi:10.1093/hropen/hoaa020.
14. Соловьёва Е.В., Канбекова О.Р., Жигалина Д.И. и др. Валидация систем преимплантационного тестирования моногенных заболеваний на единичных клетках и продуктах полногеномной амплификации. *Медицинская генетика.* 2020;19(11):63-64. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2020.11.63-64>
15. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. The use of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a committee opinion. *Fertil Steril.* 2018;109(3):429–36. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.01.002>
4. Semyachkina A.N., Voskoboeva E.Y., Nikolaeva E.A., Zakharova E.Y. Analysis of long-term observations of the large group of Russian patients with Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II). *BMC Med Genomics.*2021;14:71. <https://doi.org/10.1186/s12920-021-00922-1>
5. Verlinsky Y., Kuliev A. *Practical Preimplantation Genetic Diagnosis.* Springer. 2005:198.
6. Altarescu G, Renbaum P, Eldar-Geva T et al. Preventing mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): PGD and establishing a Hunter (46, XX) stem cell line. *Prenat Diagn.* 2011;31:853-60. doi: 10.1002/pd.2786
7. Ko D.S., Lee S.H., Park C.W., Lim C.K. Birth of a healthy baby after preimplantation genetic diagnosis in a carrier of mucopolysaccharidosis type II: The first case in Korea. *Clin Exp Reprod Med.* 2019;46(4):206-210. <https://doi.org/10.5653/cerm.2019.00094>
8. ESHRE PGT-M Working Group, Carvalho F, Moutou C, et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders *Human Reproduction Open.* 2020:1–18. doi:10.1093/hropen/hoaa018
9. UCSC genome browser. <https://genome.ucsc.edu/index.html>
10. Verlinsky Y., Kuliev A. *Atlas of Preimplantation Genetic Diagnosis. Second edition.* 2005. Taylor & Francis: 281.
11. Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация. Клинические рекомендации (протокол лечения). МЗ РФ 05 марта 2019 года № 15-4/н/2-1908. [Assisted reproductive technology and artificial insemination. Clinical guidelines (treatment protocol). Ministry of Health of the Russian Federation March 05, 2019 No. 15-4/and/2-1908]. 169p. (In Russ.) http://www.rahr.ru/pech_mat_norm.php
12. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.* 5th ed. Geneva: World Health Organization. 2010:271.
13. ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology BiopsyWorking Group, Kokkali G, Coticchio G. et al. ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT. *Human Reproduction Open.* 2020:1-12. doi:10.1093/hropen/hoaa020.
14. Soloveva E.V., Kanbekova O.R., Zhigalina D.I. et al. Validaciya sistem preimplantacionnogo testirovaniya monogennyh zbolevanij na edinichnyh kletkah i produktah polnogenomnoj amplifikacii. [Single cell and whole genome amplification product validation of preimplantation genetic testing systems for monogenic disorders]. *Medicinskaya genetika [Medical genetics]* 2020;19(11):63-64. (In Russ.) <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2020.11.63-64>
15. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. The use of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a committee opinion. *Fertil Steril.* 2018;109(3):429–36. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.01.002>

References

1. D'Avanzo F., Rigon L., Zanetti A., Tomanin R. Mucopolysaccharidosis Type II: One Hundred Years of Research, Diagnosis, and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1258; doi:10.3390/ijms21041258.
2. Hashmi M.S., Gupta V. *Mucopolysaccharidosis Type II* NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560829/>
3. Zhang C., Hao S., Meng Z. et al. Detailed pedigree analyses and prenatal diagnosis for a family with mucopolysaccharidosis type II *BMC Med Genomics.* 2021;14:175. <https://doi.org/10.1186/s12920-021-01027-5>