

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.06.38-50>

Разработка универсальной панели STR-маркеров для проведения ПГТ-М муковисцидоза с учетом специфического гаплотипа хромосом, несущих вариант F508del гена CFTR

Соловьёва Е.В., Склеимова М.М., Минайчева Л.И., Агафонова А.А., Петрова В.В., Скрыбин Н.А.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики,
Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук
634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, д. 10

Введение. Преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) развивается как вариант ранней дородовой профилактики наследственных заболеваний. Таргетный вариант ПГТ моногенного заболевания (ПГТ-М) предусматривает сочетание анализа патогенного генетического варианта и косвенных ДНК-маркеров. Перечень сцепленных с геном *CFTR* ДНК-маркеров для целей ПГТ муковисцидоза (МВ) варьирует у разных авторов.

Цель: разработка панели STR-маркеров для ПГТ МВ.

Методы. С использованием данных литературы, баз данных выбраны внутригенные и внегенные STR-маркеры, сцепленные с геном *CFTR*. Панель маркеров протестирована на образцах ДНК семи семей с МВ, в которых заболевание обусловлено патогенным вариантом F508del. Только в одной семье второй мутацией была *CFTR*dele2,3(21kb). Для тестирования применяли методы ПЦР и фрагментного анализа на генетическом анализаторе.

Результаты. Подобрана панель из 15 основных и 4 дополнительных STR-маркеров. Основная панель STR была достаточно информативна для большинства образцов родителей – носителей патогенного варианта гена *CFTR*. Дополнительная панель потребовалась в связи с тем, что в одном из изученных образцов наблюдалась низкая информативность по косвенным маркерам вследствие особого гаплотипа, выявленного у одного из обследованных.

Заключение. Разработанная нами панель, учитывающая специфический F508del – гаплотип, может служить основой ПГТ МВ.

Ключевые слова: ПГТ-М, муковисцидоз, *CFTR*, F508del, STR, преимплантационное генетическое тестирование моногенных болезней.

Для цитирования: Соловьёва Е.В., Склеимова М.М., Минайчева Л.И., Агафонова А.А., Петрова В.В., Скрыбин Н.А. Разработка универсальной панели STR-маркеров для проведения ПГТ-М муковисцидоза с учетом специфического гаплотипа хромосом, несущих вариант F508del гена *CFTR*. *Медицинская генетика* 2023; 22(6): 38–50.

Авторы 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; 1021032420800-1-3.1.2).

Конфликт интересов: Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила 01.06.2023

Development of a universal STR panel for PGT-M for cystic fibrosis, taking into account the specific haplotype of chromosomes carrying the CFTR F508del variant

Soloveva E.V., Skleimova M.M., Minaycheva L.I., Agafonova A.A., Petrova V.V., Skryabin N.A.

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

Background. Preimplantation genetic testing (PGT) is developing as a variant of early prenatal prevention of hereditary diseases. Targeted variant PGT for monogenic disease (PGT-M) involves a combination of pathogenic variant and indirect DNA markers analysis. The list of DNA markers linked to the *CFTR* gene for the purposes of cystic fibrosis PGT (PGT CF) varies by different authors.

Aim: development of a panel of STR-markers for PGT CF.

Methods Intragenic and extragenic STR markers linked to the *CFTR* gene were selected using scientific literature data and databases. The panel of markers was tested on DNA samples from seven families with CF, in which the disease is caused by the pathogenic F508del variant. Only one family had *CFTR*dele2,3(21kb) as the second mutation. For testing, PCR and fragment analysis methods were used.

Results. 15 main and 4 additional STR markers have been selected for a panel. Most of the samples of the parents carrying the pathogenic variant of the *CFTR* gene confirmed the sufficient information content of the main STR panel. An additional panel was required due

to the fact that one of the studied samples revealed low information rate for linked markers because of a special haplotype of the chromosome carrying the normal allele.

Conclusions. The developed panel, taking into account the specific F508del haplotype, can serve as a basis for PGT CF.

Keywords: PGT-M, cystic fibrosis, *CFTR*, F508del, STR, preimplantation testing for monogenic/single gene defects.

For citation: Soloveva E.V., Skleimova M.M., Minaycheva L.I., Agafonova A.A., Petrova V.V., Skryabin N.A. STR panel for preimplantation genetic testing for cystic fibrosis, taking into account the specific haplotype of chromosomes carrying the *CFTR* F508del variant. *Medical genetics [Meditsinskaya genetika]* 2023; 22(6): 38-50 (In Russ.)

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.

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

Accepted: 01.06.2023

Введение

Преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) на моногенные заболевания (ПГТ-М) — одно из новых актуальных направлений профилактики тяжелых наследственных заболеваний. При ПГТ-М генотипирование полученных с применением методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) эмбрионов проводится на ранних стадиях до имплантации и позволяет выбрать эмбрион с нормальным генотипом для переноса в полость матки.

Муковисцидоз (МВ) является частым тяжелым наследственным заболеванием и с момента внедрения ПГТ в клиническую практику занимает ведущие позиции по частоте проведения ПГТ-М в мире [1, 2]. Результаты клинического применения ПГТ на МВ были опубликованы и в России [3, 4]. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу, его причиной служат мутации гена *CFTR* (трансмембранного регулятора муковисцидоза; OMIM 602421), расположенного в локусе 7q31.2 [5]. Преобладающим патогенным вариантом гена *CFTR* во всем мире является с.1521_1523delCTT (p.Phe508del), который традиционно обозначается как F508del. В России его частота составляет около 52,8% в объединенной выборке больных МВ. На втором месте в России патогенный вариант *CFTR* деле2,3(21kb) — 6,2% [6]. Несмотря на успехи лечения МВ, актуальной остается дородовая диагностика заболевания. Основным преимуществом ПГТ по сравнению с пренатальной диагностикой является возможность выявления заболевания на максимально ранних сроках. Это позволяет предотвратить наступление беременности плодом с патологическим генотипом и существенно снижает вероятность прерывания беременности.

ПГТ МВ проводится в семьях высокого генетического риска в отношении МВ. Такое тести-

рование не является скринингом и выполняется в отношении конкретных патогенных вариантов для определенной семьи [6, 7]. ПГТ-М в отношении *CFTR*-ассоциированных заболеваний, которые нельзя отнести к тяжелым, — спорный вопрос и требует отдельного рассмотрения [7, 8]. Важнейшее значение при планировании и проведении ПГТ-М имеет медико-генетическое консультирование супружеской пары.

При выполнении ПГТ-М рекомендовано сочетание прямого анализа патогенного варианта и косвенной диагностики по сцепленным с геном полиморфным ДНК-маркерам во избежание ошибок тестирования, связанных с малым количеством образца ДНК эмбриона [6, 7, 9]. Готовых тест-систем для ПГТ МВ до настоящего времени не предложено, перечень применяемых ДНК-маркеров варьирует у разных авторов и в разных лабораториях. В качестве косвенных ДНК-маркеров применяются микросателлиты или STR (короткие tandemные повторы, short tandem repeats), либо SNP (однонуклеотидные полиморфизмы, single nucleotide polymorphisms). Распространенность SNP в геноме человека выше, однако STR-маркеры более полиморфны, для них характерен множественный аллелизм. Для целей ПГТ-М число используемых STR может быть меньше, чем SNP [9].

Некоторые ДНК-маркеры, сцепленные с геном *CFTR*, изучены лучше и чаще применяются для дородовой диагностики МВ, популяционных и эволюционных исследований МВ-хромосом [10, 11, 12]. Ранее в нашем исследовании приведены результаты анализа шести внутригенных и двух внегенных полиморфных STR-маркеров хромосом, несущих патогенные варианты F508del и *CFTR* деле2,3(21kb) гена *CFTR* [13]. F508del-хромосомы имеют особый гаплотип и содержат некоторые аллели, имеющие невысокую частоту в общей популяции. Также было показано, что хромо-

сомы с гомозиготными вариантами генотипов F508del характеризуются высокой степенью гомозиготности по внутригенным STR-маркерам, и для целей дороговой диагностики может быть полезно привлечение внегенных микросателлитов [13].

Технологические платформы генетического тестирования при ПГТ-М быстро развиваются и в настоящее время включают возможности полногеномной амплификации (WGA, whole genome amplification) и секвенирования нового поколения (NGS, next generation sequencing) наряду с таргетным подходом, основанном на тестировании патогенного варианта и сцепленных ДНК-маркеров [9]. Полногеномные технологии позволяют сочетать ПГТ-М с ПГТ на анеуплоидию (ПГТ-А). В то же время необходимо учитывать, что целью ПГТ-М, в частности в отношении МВ, служит преимущественно выявление точковых мутаций, а коммерческие полногеномные технологии на основе NGS пока адаптированы только к задачам ПГТ-А. Таргетный вариант, который в настоящее время комбинируют с WGA, на сегодняшний день остается основным подходом ПГТ-М и позволяет обеспечить надежность тестирования.

Целью настоящего исследования явилась разработка панели STR-маркеров для ПГТ-М МВ.

Методы

Подбор STR для ПГТ-М проводили из числа полиморфных ди-тетрануклеотидных STR, сцепленных с геном *CFTR*, на основании рекомендаций литературы, результатов собственных предшествующих исследований, а также поиска дополнительных STR в базах данных [7, 13, 14, 15]. После определения перечня ДНК-маркеров проводили подбор олигонуклеотидных праймеров методом ПЦР и фрагментного анализа. Анализ каждого ДНК-маркера отрабатывался сначала на тестовой ДНК, в дальнейшем проводилось исследование образцов ДНК членов семей пациентов с МВ.

Для проведения исследования использовали образцы геномной ДНК, выделенной из венозной крови. Выделение ДНК проводили сорбционным методом с помощью набора реагентов «ДНК-сорб-В» (Амплисенс, Россия). Всего обследовано 25 человек из 7 ядерных семей с МВ у ребенка. Семьи проходили обследование и стационарное лечение детей в Медико-генетическом центре (Генетической клинике) НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Из обследованных семей только одна обратилась за планированием беременности с целью ЭКО с ПГТ МВ. Осталь-

ные были приглашены специально для участия в настоящем исследовании по разработке расширенной панели косвенных маркеров для ПГТ МВ. В исследование включены семьи, в которых МВ обусловлен патогенным вариантом F508del гена *CFTR*. Семь пациентов были гомозиготами по F508del (в одной семье два ребенка) и один ребенок — компаунд-гетерозигота F508del/CFTRdele2,3(21kb). Средний возраст обследованных матерей составил 34,5 года, отцов — 37,1 лет, больных детей — 5,8 лет; все семьи были европеоидными. Дополнительно в исследование включены здоровые сибсы (два ребенка) и бабушка из одной семьи.

Семьи прошли медико-генетическое консультирование относительно возможности применения результатов исследования для ПГТ-М, получены информированные согласия. Патогенные варианты (F508del и CFTRdele2,3(21kb) были проверены у всех включенных в исследование лиц. Всего в ходе исследования изучено 50 хромосом и 29 гаплотипов неродственных индивидов, из которых 14 содержали патогенный аллель (F508del — 13 хромосом, CFTRdele2,3(21kb) — 1) и 15 — нормальный (аллель дикого типа без выявленного патогенного варианта, принадлежащий лицу без диагноза МВ).

Молекулярно-генетическое исследование проводили методом ПЦР с флуоресцентно мечеными праймерами. Состав реакции включал 0,13 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 1,5 мМ MgCl₂, 6% ДМСО (диметилсульфоксида), буфер для Taq ДНК-полимеразы, 0,005% крезолового красного. На реакцию использовали по 1 пмоль каждого праймера (F и R), 0,9 ед. Taq или Hot Start Taq ДНК-полимеразы (СибЭнзим) и 1 мкл ДНК (6–20 нг/мкл). Часть последовательностей олигонуклеотидных праймеров брали из электронного ресурса STS. Для большей части локусов выполняли собственный дизайн праймеров; поиск последовательностей проводили с использованием электронного ресурса «UCSC genome browser» [14]. Для трех STR были использованы праймеры из базы UniSTS (в настоящее время не поддерживается; D7S677 UniSTS:18390; D7S486 UniSTS:1556; D7S522 UniSTS:48216). Для проверки патогенного варианта CFTRdele2,3(21kb) использовали праймеры по [10] с образованием фрагмента 210 п.н. при делеции и его отсутствием в норме. Для анализа поли-Т полиморфизма интрона 9 применяли двухраундовую ПЦР по ранее описанной схеме [16]. Во всех сериях амплификации использовали отрицательный контроль. В общей сложности в ходе настоящего исследования проведено более 400 реакций на STR.

Детекцию проводили методами полиакриламидного гель-электрофореза (7%, буфер TBE: трис-борат-ЭДТА) для первоначальной оценки амплификации и капиллярного гель-электрофореза на генетическом анализаторе «3130xl» (Applied Biosystems, США) или «Нанофор 05» (Синтол, Россия). При проведении капиллярного электрофореза на анализаторе ПЦР-продукты комбинировали по 2-4 STR на капилляр. В качестве контрольных образцов при фрагментном анализе STR-маркеров применяли ПЦР-фрагменты данного локуса с разными аллелями, используя их в качестве аллельной лестницы. Аллели STR-маркеров выражали в размерах амплифицируемых фрагментов (п.н.), для обозначения аллелей интрона 6 и последовательности поли-Т интрона 9 использовали число повторов.

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

Результаты

С целью создания таргетной системы ПГТ МВ нами проработан перечень STR-маркеров локуса 7q31.2, тесно сцепленных с геном *CFTR*, а именно патогенным вариантом F508del. Такая панель необходима для гаплотипирования хромосом, несущих патогенные и нормальные аллели в обследуемой семье перед ПГТ-М с целью обеспечения точности и надежности диагностики при анализе малого количества ДНК. В панель включены только STR, для которых удалось достичь надежной амплификации и интерпретации результатов. В состав панели входит наиболее частый патогенный вариант при МВ — F508del. В табл. 1 представлены перечень и характеристика ДНК-маркеров, подобранных нами для ПГТ МВ. Также в табл. 1 представлены данные по гетерозиготности STR, полученные в ходе настоящего исследования.

В состав панели вошли 15 основных и 4 дополнительных ДНК-маркеров. Из основных маркеров 6 являются внутригенными интронными STR. Девять STR —внегенные, фланкирующие ген *CFTR* (4 с одной стороны и 5 с другой) на расстоянии, не превышающем 1,3-1,6 млн п.н. Для описанных в литературе и базах данных STR применяли, преимущественно, зарегистрированные названия. Для дополнительно найденных нами маркеров использовали собственное обо-

значение (плечо хромосомы и первые цифры локализации в геноме на основании GRCh38/hg38).

Из перечня панели STR (табл.1) девять входят в список ДНК-маркеров, часто применяемых при ПГТ МВ: IVS1(AC), D7S677, IVS9(AC), IVS20(AC), D7S486, D7S633, D7S2460, D7S2502, D7S2847 [7]. Часть STR была включена нами в панель тестирования на основании наших предыдущих данных по достаточной гетерозиготности для носителей F508del: IVS6 (AATC), IVS9 (поли-Т), D7S655 [13]. Для региона downstream от гена *CFTR* подобрано три дополнительных STR. Четыре upstream STR включены в качестве дополнительной панели.

Последовательности олигонуклеотидных праймеров и размеры фрагментов, полученные на основании обследования 7 семей с МВ в ходе настоящего исследования, представлены в табл. 2. Для четырех маркеров дополнительной панели пределы варьирования изучены только для трех семей.

Поскольку за методическую основу тестирования взят фрагментный анализ ПЦР-продуктов, один из праймеров в паре имел флуоресцентную метку FAM или R6G для удобства комбинирования фрагментов при капиллярном электрофорезе. Примеры результатов фрагментного анализа патогенного варианта, динуклеотидного STR интрона 1 и тетрануклеотидного внегенного STR представлены на рисунке.

Для удобства анализа патогенного варианта в ходе детекции в программе «Gene Mapper» были настроены бины на нормальный и мутантный аллель (рисунок, А). Каждый из исследованных микросателлитов имеет свои особенности профиля пиков при фрагментном анализе. Анализ STR часто осложнен присутствием статтеров или послепиков на электрофореграмме. В большинстве случаев они не мешают интерпретации результатов (интрон 1 на рисунке, Б). Для некоторых локусов возможна сложная для интерпретации форма пика. Три- и тетрануклеотидные STR чаще дают легко интерпретируемые пики (7q1184, рис. В). Однако выбор STR для ПГТ-М ограничен наличием определенных STR в интересующей области и меньшим уровнем гетерозиготности три- и тетрануклеотидных STR.

Все локусы из основной панели были протестированы на образцах ДНК семи супружеских пар, имеющих детей с МВ. В связи с тем, что для ПГТ-М основное значение имеет достаточное число фланкирующих информативных ДНК-маркеров, в табл. 3 полученные результаты представлены в виде информативности (гетерозиготности) и неинформативности (гомозиготности) исследованных STR.

Таблица 1. STR-маркеры для ПГТ-М МВ

Table 1. STR markers for cystic fibrosis PGT-M

	Название локуса	Локализация ¹	Повтор	Локализация в геноме (старт, GRCh38/hg38)	Гетерозиготность ²	
					[15, 16]	N=14
*	7q1155	2,0	AT	chr7:115545635	0,8	-
*	7q1158 (D7S2502)	1,7	AC	chr7:115818137	0,8	-
*	7q1159	1,6	AC	chr7:115946397	0,7	-
*	7q1161 (D7S2543)	1,4	AC	chr7:116163057	0,6	-
1	D7S486	1,3	AC	chr7:116254748	0,8	0,8
2	D7S522	1,1	AC	chr7:116432742	0,7	0,8
3	D7S2460	0,8	AC	chr7:116767962	0,7	0,6
4	D7S633	0,2	AC	chr7:117370805	0,6	0,7
5	CFTR IVS1	Инtron 1	AC	chr7:117490313	0,7	0,8
6	CFTR D7S677	Инtron 1	AC	chr7:117499430	0,6	0,8
7	CFTR IVS6	Инtron 6	AATC	chr7:117536515	0,3	0,7
8	CFTR IVS9 AC	Инtron 9 (8)	AC	chr7:117548334	0,4	0,8
9	CFTR IVS9 T	Инtron 9 (8)	T	chr7:117548629	0,3	0,9
	CFTR F508del	Экзон 11 (10)	-			
10	CFTR IVS20 AC	Инtron 20 (17b)	AC	chr7:117612007	0,4	0,5
11	7q1177	0,2	AC	chr7:117773649	0,9	0,9
12	7q1179	0,4	AC	chr7:117999222	0,8	0,9
13	7q1184	0,9	AGAT	chr7:118464804	0,7	0,7
14	D7S655	1,5	AC	chr7:119028265	0,6	0,9
15	D7S2847	1,6	AGAT	chr7:119179487	0,8	1,0

Примечание: ¹ — Для внегенных локусов — расстояние от патогенного варианта F508del в млн п.н., для внутригенных — обозначение интронов и экзонов по современной номенклатуре (в скобках — традиционное); ² — гетерозиготность по данным «WebSTR» для европейской популяции (для поли-Т последовательности интрона 9 по данным Маркова с соавт. 2017) и по результатам настоящего исследования для носителей F508del; * — STR-маркеры дополнительной панели.

Индивидуальная сумма информативных STR подсчитана с каждой стороны от патогенного варианта в экзоне 11 для всех носителей F508del и интроне 1 для носителя CFTRdele2,3(21kb), соответственно. Максимальное число информативных маркеров составило 9 и 6 у женщины из семьи 5, минимальное — 0 и 3 у мужчины в семье 4. Достаточное число информативных маркеров (от 3 до 9) с каждой стороны от патогенного варианта было выявлено у всех родителей из обследованных семей за исключением вышеуказанного мужчины из семьи 4.

Общее число информативных STR-маркеров, представленных в табл. 3, также проанализировано индивидуально по каждому микросателлиту. Расчетные значения гетерозиготности по этим данным вынесе-

ны в табл. 1. Минимальная гетерозиготность составила 0,5 для AC-повторов интрона 20, максимальная — 1,0 (D7S2847). Большинство маркеров в обследованной выборке носителей подтвердили достаточный уровень информативности — выше 0,70.

В обследованных семьях были обнаружены некоторые особенные аллели и варианты генотипов. Так, для гетерозиготных по CFTRdele2,3(21kb) генотипов была характерна гемизиготность по локусу D7S677 интрона 1, который попадает в область делеции. В то же время в предшествующем локусе IVS1 AC присутствовали оба аллеля. В одной из семей нами обнаружен редкий аллель полиморфизма поли-Т интрона 9 — 11T. Данный аллель выявлен в F508del-хромосоме у матери и у больного МВ ребенка. Семья прожива-

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры для анализа STR-маркеров, сцепленных с геном *CFTR*, и размеры амплифицируемых фрагментов**Table 2.** Oligonucleotide primers for analysis of STR markers linked to the *CFTR* gene and sizes of amplified fragments

	Название	F / R	Последовательность, 5'-3'	Размер фрагмента, п.н.
1	CFTR F508del	F	gtgattatgggagaactgga	N=158, del=155
		R	FAM-tttgatgacgcttctgtatct	
2	CFTR IVS1	F	tgaacctcagctactctcgt	232-244
		R	FAM- ttggacttgttagccatcat	
3	CFTR D7S677	F	FAM-atcattcactatgggatagc	del, 278-292
		R	gaattacaagtcactctatacaaaa	
4	CFTR IVS6	F	R6G-gcccatctgttgaataaaag	6 Rep=203 7 Rep=207
		R	ccagcagtatgccttaacag	
5	CFTR IVS9 AC	F	gtgtttatgtaccccgctta	166-184
		R	R6G-acggtttctagagacatga	
6	CFTR IVS20 AC	F	R6G-catattggtgaagggtccta	260-272
		R	atttgaaaaacatggcactt	
7	D7S486	F	R6G-aaaggccaatggtatatccc	134-150
		R	gccaggtgattgatagtc	
8	D7S522	F	FAM-gccaaactgccacttctc	218-224
		R	acgtgttatgccactccc	
9	D7S633	F	FAM-tggggagtcctttaacagta	344-350
		R	aggcagattgatcacatgag	
10	D7S655	F	aatgggtctggaacaattag	154-172
		R	FAM-ctagtgggttttggtttga	
11	D7S2460	F	agtgaactaccagtatcact	187-191
		R	FAM-gataccaaaggacacatggt	
12	D7S2847	F	ttcaccttcagaaagtattgc	188-212
		R	FAM-agccacatagtgagggtgtt	
13	7q1155*	F	R6G-cttgtagggatctctctca	300-312
		R	atgagcatgaacaagacct	
14	7q1158*	F	FAM-ccagtggttttagtcattgt	243-261
		R	tgatgctcatggttgga	
15	7q1159*	F	FAM-gctcttcagaccctaaatgt	350-358
		R	gaaagaaggaaagagcaagc	
16	7q1161*	F	aacacagaggcaacatatgt	158-164
		R	R6G-ttgttaagcctacattgcct	
17	7q1177	F	atgaatgtctggaggacaag	257-274
		R	FAM-tgaccaggctttctattgt	
18	7q1179	F	gctttatgtgccagtttttc	243-264
		R	R6G-aaaataaattcccacccta	
19	7q1184	F	ggtcacatccaaattgagtt	289-301
		R	R6G-gtacaggccaacaggtact	

Примечание: * – STR дополнительной панели; N – нормальный аллель; Rep – число повторов, del – отсутствие аллеля при патогенном варианте CFTRdel2,3(21kb).

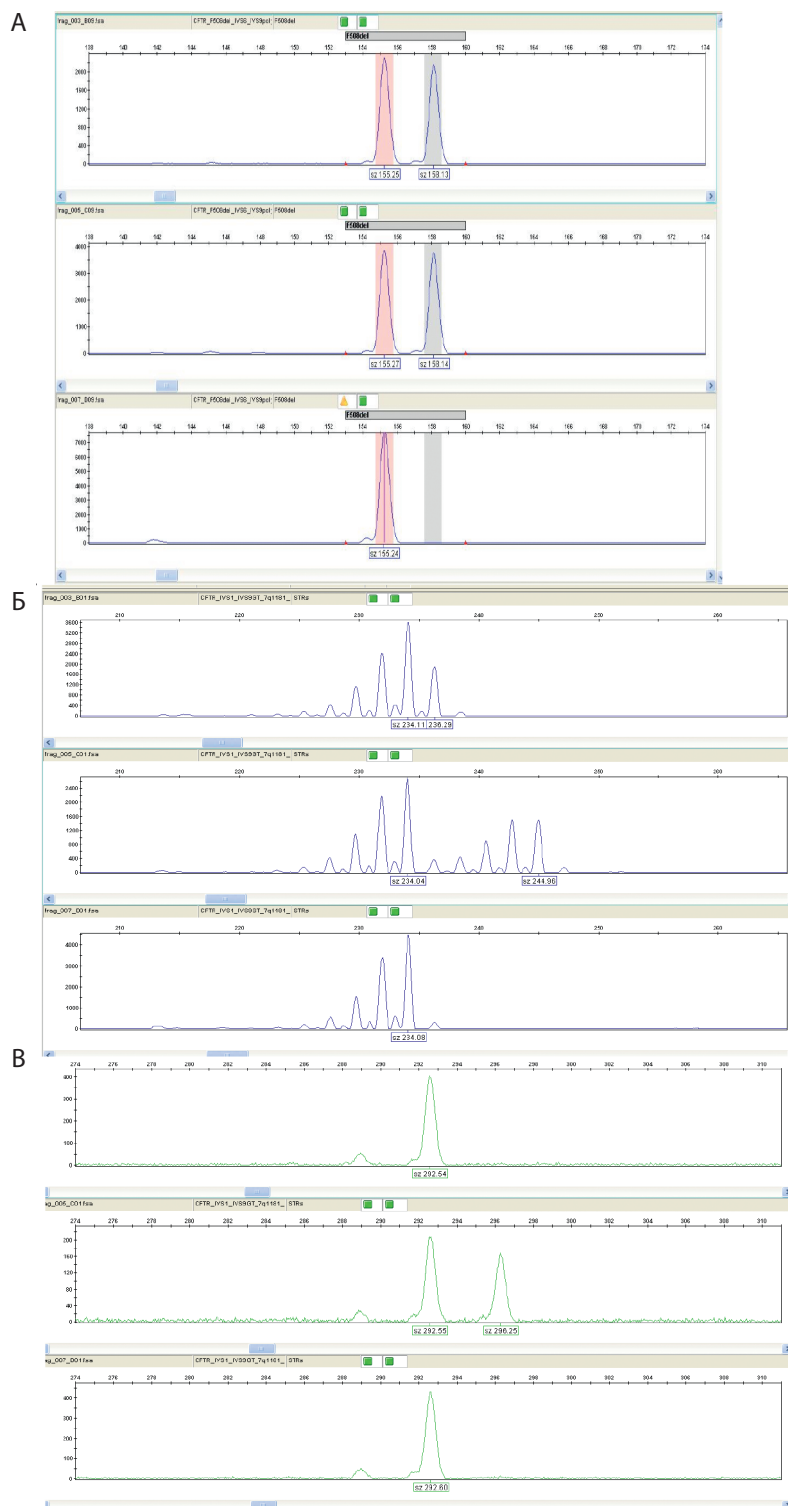


Рисунок. Примеры результатов фрагментного анализа продуктов ПЦР патогенного варианта F508del гена *CFTR* в семье (А: красным бином обозначен мутантный аллель, серым – нормальный; FAM), внутригенного динуклеотидного STR интрона 1 (Б; FAM) и тетра nukлеотидного внегенного STR локуса 7q1184 (Б; R6G); образцы: отец, мать, ребенок.

Figure. Examples of the fragment analysis of PCR products of the pathogenic F508del variant of the *CFTR* gene (A: the red bin denotes the mutant allele, the gray bin denotes the normal one; FAM), the intra-genic dinucleotide STR in intron 1 (Б; FAM), and the tetranucleotide extragenic STR in 7q1184 (Б; R6G).

ет в Кемеровской области, заболевание у ребенка заподозрено по результатам неонатального скрининга и характеризуется преимущественно кишечными проявлениями; диагноз поставлен в возрасте 1 года. Помимо одного случая 11Т во всех остальных изученных в нашем исследовании F508del-хромосомах выявлялся аллель 9Т.

В табл. 4 представлены детальные данные гаплотипирования семьи (проживают в Томской области; один из родителей отца немец), в которой разработанная нами стандартная панель STR-маркеров не позволила выявить достаточное для ПГТ-М число информативных маркеров у супруга. В связи с данным случаем была предложена дополнительная панель из четырех STR-маркеров; результаты также представлены в табл. 4.

В представленной в табл. 4 семье один ребенок болен МВ и имеет гомозиготный генотип по F508del,

второй ребенок здоров и является носителем материнской хромосомы с патогенным вариантом F508del. Как видно из результатов гаплотипирования семьи, F508del-несущие хромосомы, демонстрируют практически одинаковые гаплотипы по изученным внутригенным STR и различаются только по динуклеотидному полиморфизму AC(GT) интрона 9. По внутригенным STR материнская и отцовская хромосомы у больного МВ ребенка различимы только по данному полиморфизму. По внегенным маркерам отцовская и материнская хромосомы имеют достаточно различий. В данной семье полностью неинформативен только один STR-маркер – AC-повтор интрона 20. В обследованной семье ДНК матери (D1564) демонстрирует много информативных STR, однако в образце отца обнаружено большое число гомозиготных, неинформативных вариантов по изученным STR основной панели. Отцовский гаплотип хромосомы с нормальным

Таблица 3. Информативность (гетерозиготность) STR-маркеров у обследованных супружеских пар – носителей патогенного варианта гена *CFTR* (F508del для всех, за исключением одного родителя с CFTRdele2,3(21kb)

Table 3. Informativeness (heterozygosity) of STR-markers in the examined couples – carriers of the pathogenic variant of the *CFTR* gene (F508del for all, except for one parent with CFTRdele2,3(21kb)

STR		1 (F4)		2 (F100)		3 (F104)		4 (F115)		5 (F149)		6 (F277)		7 (F479)		Всего информ.
		О	М	О*	М	О	М	О	М	О	М	О	М	О	М	
1	D7S486							н				н	н			11
2	D7S522	н						н		н						11
3	D7S2460						н	н		н		н			н	9
4	D7S633	н	н			н		н								10
5	IVS1						н	н		н						11
6	D7S677					н		н							н	11
7	IVS6			н		н		н							н	10
8	IVS9 AC					н		н							н	11
9	IVS9 T			н				н								12
Всего информ.		7	8	6*	9	5	7	0	9	6	9	9	7	8	5	
10	IVS20 AC		н		н		н	н	н	н			н			7
11	7q1177				н			н								12
12	7q1179	н														13
13	7q1187		н					н				н		н		10
14	D7S655				н					н						12
15	D7S2847															14
Всего информ.		5	4	6	3	6	5	3	5	4	6	5	5	5	6	

Примечание: О – отец, М – мать; * носитель патогенного варианта CFTRdele2,3(21kb); серая заливка и «н» – неинформативный STR (гомозигота).

аллелем оказался похож на гаплотип F508del-несущей хромосомы. Вследствие выявленных особенностей гаплотипов, гомозигота по F508del (D3374) и гетерозиготный носитель (D3376) фактически неразличимы по достаточно протяженному фрагменту внутригенных и внегенных локусов с одной стороны от патогенного варианта, соответственно, входящие в эту область STR не позволяют различить хромосомы, несущие нормальный и патогенный аллели.

Дополнительная панель полиморфных микросателлитных маркеров была разработана в связи с выявленными особенностями F508del-подобного гаплотипа у отца в семье F115 (табл. 4). В табл. 4 представлены результаты гаплотипирования семьи по четырем дополнительным STR. Расширение панели STR по-

зволило выявить три информативных STR upstream от патогенного варианта. В приложении к ПГТ МВ это позволит четко различать отцовские хромосомы с патогенным вариантом и без него для обеих фланкирующих F508del областей.

Нами проводилась валидация подобранной панели STR на тестовых WGA-продуктах для фрагментов трофобластической оболочки преимплантационных эмбрионов, а также единичных лимфоцитов без полногеномной амплификации. Однако во всех этих случаях использовали двухраундовую ПЦР.

Все обследованные семьи включали полное трио — мать, отец и ребенок. В отдельных случаях генотипы по STR всех членов семьи представляли собой одинаковые гомозиготы, что позволяет сделать вывод об их

Таблица 4. Детальные результаты гаплотипирования одной из обследованных семей с использованием основной и дополнительной панелей STR

Table 4. Detailed results of family haplotyping using the main and additional STR panels

		Гаплотипы семьи F115			
	Название локуса	Отец (D3375)	Мать (D1564)	Ребёнок, МВ (D3374)	Ребёнок, (D3376)
1*	7q_1155	312/304	312/302	312/302	304/302
2*	7q_1158	243/261	260/261	243/261	261/261
3*	7q_1159	354/354	354/350	354/350	354/350
4*	7q_1161	158/162	162/162	158/162	162/162
1	D7S486	144/144	146/134	144/134	144/134
2	D7S522	224/224	218/224	224/224	224/224
3	D7S2460	187/187	191/189	187/189	187/189
4	D7S633	346/346	344/346	346/346	346/346
5	CFTR	IVS1	234/234	234/234	234/234
6		D7S677	284/284	284/284	284/284
7		IVS6	6/6	6/6	6/6
8		IVS9 AC	182/182	182/170	182/170
9		IVS9 полиТ	9Т/9Т	9Т/9Т	9Т/9Т
		F508del	m/N	m/m	N/m
10		IVS20 AC	264/264	264/264	264/264
11	7q_1177	267/267	271/269	267/269	267/269
12	7q_1179	254/250	246/258	254/258	250/258
13	7q_1184	289/289	289/297	289/297	289/297
14	D7S655	170/172	154/168	170/168	172/168
15	D7S2847	196/188	196/188	196/188	188/188

Примечание: полужирным шрифтом и подчеркиванием отмечены аллели мутантных хромосом; серой заливкой отмечены гомозиготные локусы; * — дополнительная панель маркеров.

информативности, но не позволяет их гаплотипировать без дополнительных данных. Включение в исследование других членов семьи позволяет подтвердить сцепление и гаплотипировать гетерозиготные в трио локусы. Например, локус D7S2847 в семье (табл.4) гаплотипирован благодаря включению в исследование образца здорового ребенка-носителя (D3376).

Обсуждение

Основой молекулярно-генетических исследований при таргетном варианте ПГТ-М является сочетание прямой и косвенной диагностики [6, 7, 9]. Первым этапом такой технологии обычно служит поиск полиморфных STR, тесно сцепленных с причинным геном. Далее стандартно следует тестирование подобранных STR на образцах ДНК семьи, с целью выбора информативных в отношении хромосомы, содержащей патогенный аллель. Информативность полиморфных STR индивидуальна, и информативные в одной семье ДНК-маркеры могут быть неинформативны для другой, что, в том числе, демонстрируют и наши данные (табл.3). Стандартных таргетных панелей для ПГТ-М ни для каких заболеваний до настоящего времени фактически не разработано.

В нашем исследовании проведена разработка достаточно широкой панели STR-маркеров для косвенной диагностики MB в ходе ПГТ-М. Панель включает 6 *CFTR*-внутригенных и 9 внегенных STR-маркеров в пределах 1,6 млн п.н. с каждой стороны от гена *CFTR* (табл. 1). Также предложена дополнительная панель из 4-х STR в пределах 2 млн п.н. согласно рекомендациям «ESHRE PGT Consortium» [9]. Проверка панели выполнена с привлечением образцов отягощенных семей, в которых MB обусловлен мажорным патогенным вариантом F508del гена *CFTR*. Только в одной семье были разные патогенные варианты — материнский F508del и отцовский CFTRdele2,3(21kb). Предполагается, что данная панель может служить универсальной базой таргетного подхода ПГТ MB не только для случаев патогенного варианта F508del, но и других патогенных вариантов. При этом потребуются дополнение системы исследования дизайном и проверкой конкретного патогенного варианта.

Полученные нами данные о гетерозиготности STR, сцепленных с геном *CFTR* (табл. 1), не отражают российскую популяцию ввиду специфичности выборки — включены исключительно носители патогенного варианта гена, а также небольшого объема выборки. Других данных о частотах изученных нами микросателлитов

в российской популяции в доступной литературе нами не найдено. Для целей ПГТ-М гетерозиготность соответствует информативности. Детальные данные по информативности для каждой семьи представлены в табл. 3. Результаты нашей работы свидетельствуют о том, что во всех семьях за исключением одной выявлено достаточное число информативных STR (табл. 3).

При разработке систем ДНК-маркеров для ПГТ-М обычно выбор делается в пользу маркеров с высоким популяционным уровнем гетерозиготности [9]. В то же время гетерозиготность в семьях по определенным сцепленным с геном STR может отличаться от популяционных значений вследствие наследования гаплотипов, характерных для частых мутаций. В своем исследовании мы фиксировали определенные различия по частоте гетерозиготности в общей европейской популяции по данным электронного ресурса WebSTR и в нашей группе носителей патогенного варианта гена *CFTR*. Для части локусов мы обнаружили более высокие показатели гетерозиготности у носителей F508del в сравнении с популяционными данными, в частности для D7S677, интрона 6, интрона 9 (табл. 1). Это связано с тем, что во всех F508del-содержащих хромосомах присутствовали более редкие для общей популяции аллели. Очевидно, что особенности гаплотипа хромосом, несущих патогенные варианты, следует учитывать для оценки гетерозиготности носителей, особенно по внутригенным STR. Полученные в настоящем исследовании данные согласуются с ранее полученными собственными результатами на другой выборке MB-носителей для внутригенных маркеров [13]. Для AC-повторов интрона 20 нами выявлен невысокий уровень гетерозиготности (0,5), сопоставимый с популяционным (0,4) и собственными более ранними данными (0,3). Данный STR может расцениваться как менее значимый для ПГТ MB.

Внутригенные ДНК-маркеры часто рекомендованы как приоритетные для косвенной дородовой диагностики как пренатальной, так и преимплантационной в связи с их более тесным сцеплением с патогенным вариантом. Однако в определенных случаях применение внутригенных маркеров может иметь ограничения. При гомозиготном состоянии по F508del невозможно различить материнскую и отцовскую хромосомы по большинству внутригенных STR вследствие специфического F508del-гаплотипа. Это демонстрируют результаты как предыдущих исследований [13], так и настоящего исследования (табл. 4). Особый риск для ПГТ MB несет невозможность различить по внутригенным STR носительство и комбинацию гомозиготного по мутации генотипа эм-

бриона с контаминацией родительской ДНК. Внегенные маркеры более полиморфны на F508del-содержащих хромосомах и дают возможность преодолеть проблему специфичного F508del-гаплотипа при ПГТ-М.

Детальный анализ STR-профиля F508del-несущих хромосом, разрабатываемого для целей ПГТ-М, в свою очередь предоставляет новые сведения для популяционной и эволюционной генетики МВ.

При применении панели STR непосредственно в ПГТ-М анализ локусов должен сочетаться с предшествующей WGA либо выполняться в «гнездовой» (nested) ПЦР. Для клинического использования обязательным является предварительный этап валидации системы тестирования на единичных клетках. Проработанные нами косвенные STR-маркеры могут быть использованы не только для преимплантационной, но и для пренатальной диагностики. В случае пренатальной диагностики такой объем косвенных ДНК-маркеров не требуется, поскольку она не связана с экстремально низкими концентрациями ДНК, как ПГТ-М. При использовании нашей системы молекулярного тестирования на большей выборке границы размеров выявляемых фрагментов, указанных в табл. 2 будут, очевидно, расширены.

Систему амплификации при ПГТ-М не следует перегружать ДНК-маркерами. В ПГТ-М включают исключительно информативные локусы. Согласно рекомендациям ESHRE PGT Consortium обычно достаточным является наличие двух информативных маркеров с каждой стороны от патогенного варианта [9]. Число маркеров зависит от применяемой системы (например, комбинации с WGA), частоты ADO (выпадения аллеля, allele drop out). На практике лаборатории часто увеличивают число сцепленных с исследуемым геном ДНК-маркеров для повышения точности диагностики. Помимо ADO к факторам риска ошибок ПГТ-М, связанным с малым количеством ДНК, относится плохая амплификация отдельных локусов, преимущественная амплификация одного аллеля, контаминация родительской или неродственной ДНК. Микросателлиты могут не всегда иметь простые для интерпретации пики амплификации (статтеры, послепики). В связи с этим конкретной семье после ее гаплотипирования по предложенной нами основной панели мы можем рекомендовать выбрать по 2-4 полностью информативных, фланкирующих патогенный вариант STR-маркера с надежной интенсивностью амплификации на единичных клетках и, по возможности, хорошо интерпретируемой формой пиков.

Некоторые сложные в исследовании полиморфизмы также можно отнести к менее приоритетным для ПГТ-М. Поли-Т полиморфизм — достаточно хорошо изученный

ДНК-маркер, подходящий для косвенной диагностики МВ [13, 16]. Известна ассоциация F508del с 9Т-аллелем. Гетерозиготность этого локуса в общей популяции не высока. Так, в российской популяции (N=2261) она составила всего около 0,3 в связи с преобладанием генотипа 7Т/7Т [16]. Однако в группе носителей гетерозиготность по поли-Т полиморфизму существенна и составила 0,9 (табл.3). В то же время анализ данного полиморфизма несколько сложнее, чем других локусов нашей панели. Для идентификации аллелей 5, 7 или 9Т требуются двухраундовая ПЦР и контрольные образцы с известными генотипами. Детали поли-Т тестирования не приведены в настоящем исследовании, так как детально описаны в более ранней публикации [16].

При проведении настоящего исследования в одной из семей в F508del-хромосоме обнаружен редкий аллель 11Т интрона 9. Ранее в собственных исследованиях такого аллеля выявлено не было [13, 16]. В литературе описаны единичные случаи аллеля 11Т, его частота и клиническое значение до настоящего времени не ясны [17].

К поли-Т полиморфизму интрона 9 непосредственно примыкают полиморфные AC(GT)-повторы. Теоретически, для дородовой диагностики МВ можно было бы использовать анализ комплексного аллеля «AC+поли-Т», однако для F508del-гаплотипа это не представляется целесообразным. Так, аллель 9Т преимущественно сцеплен с аллелем из 10 повторов AC, а наиболее распространенным в хромосомах, несущих нормальный аллель, вариантом является 11AC+7Т, что в сумме не даёт различий в размере фрагментов. Поэтому эти аллели лучше исследовать раздельно, либо отличным от фрагментного анализа методом. Анализ как поли-Т полиморфизма интрона 9, так и примыкающих AC может усложнять ПГТ-М. При наличии достаточного числа информативных маркеров данные полиморфные локусы можно не включать в ПГТ-М МВ. В настоящее исследование мы не включали GT(AC)-повторы, непосредственно примыкающие к поли-Т, однако включали другие более полиморфные и достаточно информативные для гетерозиготных F508del-носителей CA-повторы интрона 9.

Дополнительная панель STR-маркеров разработана нами в связи с возможностью столкнуться с редкими генотипами и гаплотипами при подготовке к ПГТ-М с высоким уровнем гомозиготности по ДНК-маркерам. В связи с этим информативных для ПГТ-М STR-маркеров может оказаться недостаточно. Так, в нашем исследовании в одной из 7 семей у мужчины мы обнаружили особый гаплотип хромосомы с нормальным аллелем,

который имел большое сходство с F508del-гаплотипом (табл. 4, образец ДНК D3375). У этого мужчины выявлено большое число гомозиготных STR-маркеров и, соответственно, недостаточное число информативных STR из основной панели с одной стороны от патогенного варианта. Распространенность такого F508del-подобного гаплотипа в российской популяции не ясна. На основании относительно редкой частоты ряда аллелей, характерных для F508del-хромосом (например, аллель 9T интрона 9 встречается в популяции с частотой около 9%), можно предполагать, что F508del-подобный гаплотип является относительно редким, по крайней мере в европейских популяциях. С помощью STR-маркеров дополнительной панели информативные маркеры для описанного семейного случая найдены.

Альтернативой таргетному подходу ПГТ МВ, на который ориентирована предлагаемая нами панель STR-маркеров, служат полногеномные методы ПГТ-М. Потенциально полногеномное секвенирование способно установить большинство мутаций гена. Однако приложения для ПГТ, основанные на NGS, разработаны пока только для выявления хромосомных нарушений и имеют ограничения в отношении разрешающей способности. Ни одна современная коммерческая полногеномная система для ПГТ не гарантирует выявление моногенных заболеваний. В отдельных исследованиях проводятся адаптация NGS к задачам ПГТ-М и проработка выявления патогенных вариантов в комбинации с минигаплотипами по SNP-маркерам. Так, в исследовании S. Chamaoui с соавт. предложена стратегия универсального подхода ПГТ МВ в отношении любой мутации гена *CFTR* в комбинации с ПГТ-А методом NGS [18]. Подход авторов подразумевает прямое секвенирование гена *CFTR* с анализом 38 тесно сцепленных с геном SNP (34 внутригенных и 4 внегенных) с первоначальной мультиплексной амплификацией фрагментов гена и фланкирующих областей. Авторы приводят данные о ПГТ для 17 супружеских пар с риском МВ, результатах тестирования 109 эмбрионов после первоначальной полногеномной амплификации [18]. Используемые исследователями SNP, хотя и были преимущественно внутригенными, показали достаточную информативность и позволили зафиксировать ADO в ходе тестирования.

Использование NGS длинных фрагментов ДНК потенциально позволяет проводить гаплотипирование хромосом, несущих патогенные варианты, без семейного анализа. С использованием такого подхода в исследовании D. Dilernia с соавт. проанализированы 14 образцов ДНК пациентов с МВ, гомози-

готных и компаунд-гетерозиготных по F508del [19]. Авторы показали, что F508del-несущие хромосомы демонстрируют чрезвычайно консервативный внутригенный гаплотип, что согласуется с результатами нашего исследования в отношении внутригенного STR-профиля F508del-хромосом.

Несмотря на мощность методов NGS, предлагаемое сочетание внегенных и внутригенных STR-маркеров имеет определенные преимущества в отношении косвенной диагностики при ПГТ-М. Панель STR позволяет охватывать интересующую в отношении МВ область гаплотипирования меньшим числом «реперных» полиморфных ДНК-маркеров. Наши данные подтверждают достаточную полиморфность и информативность 15 внутригенных и внегенных STR для выявления родительских хромосом, несущих патогенный и нормальный генетические варианты, а также артефактов амплификации. По результатам проведенного исследования достаточная степень гетерозиготности всех включенных в панель STR подтвердилась. Исключение составил один случай с особым генотипом, для которого потребовалось включение дополнительных STR. Мы рекомендуем дополнительную панель *CFTR*-сцепленных STR, если по результатам обследования семьи с использованием основной панели у кого-то из супругов, планирующих ЭКО с ПГТ-М, не будет обнаружено достаточное число информативных маркеров, в частности, при носительстве патогенной F508del-хромосомы в сочетании с F508del-подобным гаплотипом хромосомы, несущей нормальный аллель.

Литература

1. Harper J.C., Wilton L., Traeger-Synodinos J. et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. Human Reproduction Update. 2012;18(3):234–247. doi:10.1093/humupd/dmr052.
2. van Montfoort A., Carvalho F., Coonen E. et al. ESHRE PGT Consortium data collection XIX–XX: PGT analyses from 2016 to 2017. Human Reproduction Open. 2021;00(0):1–10. doi:10.1093/hropen/hoab024.
3. Базанов П.А., Гоголевский П.А., Гоголевская И.К. и др. Первые успешные результаты проведения в России преимплантационной генетической диагностики муковисцидоза. Медицинская генетика. 2009;2:25–29.
4. Соловьёва Е.В., Назаренко Л.П., Татару Д.А. и др. Профилактика муковисцидоза и применение вспомогательных репродуктивных технологий. Сб. тез. XIV Национального конгресса «Актуальные проблемы муковисцидоза». 2019, Красноярск: 38–39. <https://mukoviscidoz.org/doc/kongress/kongress-tezis-2019.pdf>
5. OMIM *602421. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR. <https://omim.org/entry/602421>
6. Национальный консенсус (2-е издание) «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» 2018 / Под ре-

- дакцией Кондратьевой Е.И., Каширской Н.Ю., Капанова Н.И. — М: ООО «Компания БОРГЕС». 2018; 356. <https://mukoviscidoz.org/doc/konsensus/2019/konsensus-2019-bez-rentgenogram.pdf>
7. Girardet A., Viart V., Plaza S. The improvement of the best practice guidelines for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis: toward an international consensus. *European Journal of Human Genetics*. 2016;24:469–478. doi:10.1038/ejhg.2015.99.
 8. Bienvenu T., Lopez M., Girodon E. Molecular Diagnosis and Genetic Counseling of Cystic Fibrosis and Related Disorders: New Challenges. *Genes*. 2020;11(6):619. doi:10.3390/genes11060619
 9. ESHRE PGT-M Working Group, Filipa Carvalho F., Moutou C, Dimitriadou E. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders. *Human Reproduction Open*. 2020:1–18. doi:10.1093/hropen/hoaa018.
 10. Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза. *Интермедика*, Санкт-Петербург. 2002:256.
 11. Furgeri D.T., Marson F.A.L., Correia C.A.A. et al. Cystic fibrosis transmembrane regulator haplotypes in households of patients with cystic fibrosis. *Gene*. 2018;30(641):137–143. doi: 10.1016/j.gene.2017.10.052.
 12. Petrova N.V., Kashirskaya N.Y., Vasilyeva T.A. et al. High frequency of complex CFTR alleles associated with c.1521_1523delCTT (F508del) in Russian cystic fibrosis patients. *BMC Genomics*. 2022;23:252. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08466-z>.
 13. Маркова Е.В., Татару Д.А. STR-маркеры хромосом, несущих мутации F508del и CFTRdele2,3(21kb) гена CFTR. *Медицинская генетика*. 2017;16(6):9–20.
 14. UCSC genome browser. <https://genome.ucsc.edu/index.html>
 15. WebSTR: a population-wide database of short tandem repeat variation in humans <http://webstr.ucsd.edu/>
 16. Маркова Е.В., Татару Д.А., Преда О.Г. Фрагментный анализ полиморфизма (TG)mTn интрона 8 гена CFTR. *Медицинская генетика*. 2017; 16(1):11–19.
 17. Kobler D., Modi H., Goldman B. Identification of an 11T allele in the polypyrimidine tract of intron 8 of the CFTR gene. *Genet Med*. 2006;8(2):125–8. doi:10.1097/01.gim.0000200217.85820.47.
 18. Chamayou S., Sicali M., Lombardo D. et al. Universal strategy for preimplantation genetic testing for cystic fibrosis based on next generation sequencing // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020: 37:213–222. doi.org/10.1007/s10815-019-01635-2.
 19. Dileria D., Amin P., Flores J. et al. Mutation profiling of the c.1521_1523delCTT (p.Phe508del, F508del) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator allele using haplotype-resolved long-read next generation sequencing. 2022. 43(5):595–603. doi: 10.1002/humu.24352.
 20. implantation genetic diagnosis for cystic fibrosis in Russia. *Medicinskaya genetika [Medical genetics]*. 2009;2:25–29. (In Russ.)
 4. Soloveva E.V., Nazarenko L.P., Tataru D.A. et al. Profilaktika mukoviscidoza i primeneniye vspomogatel'nykh reproduktivnykh tekhnologiy. [Prevention of cystic fibrosis and the use of assisted reproductive technologies]. Abstract XIV National Congress «Actual problems of cystic fibrosis». Krasnoyarsk. 2019:38–39. (In Russ.) <https://mukoviscidoz.org/doc/kongress/kongress-tezis-2019.pdf>
 5. OMIM *602421. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR. <https://omim.org/entry/602421>
 6. Nacional'nyy konsensus (2-e izdanie) «Mukoviscidoz: opredeleniye, diagnosticheskiye kriterii, terapiya» / Pod redakciey Kondrat'evoy E.I., Kashirskoy N.Y.U., Kapranova N.I. — М: ООО «Компания БОРГЕС». [National consensus (2nd edition) «Cystic fibrosis: definition, diagnostic criteria, therapy» / Edited by Kondratieva E.I., Kashirskaya N.Y., Kapranov N.I. - М: BORGES]. 2018; 356. (In Russ.) <https://mukoviscidoz.org/doc/konsensus/2019/konsensus-2019-bez-rentgenogram.pdf>
 7. Girardet A., Viart V., Plaza S. The improvement of the best practice guidelines for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis: toward an international consensus. *European Journal of Human Genetics*. 2016;24:469–478. doi:10.1038/ejhg.2015.99.
 8. Bienvenu T., Lopez M., Girodon E. Molecular Diagnosis and Genetic Counseling of Cystic Fibrosis and Related Disorders: New Challenges. *Genes*. 2020;11(6):619. doi:10.3390/genes11060619
 9. ESHRE PGT-M Working Group, Filipa Carvalho F., Moutou C, Dimitriadou E. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders. *Human Reproduction Open*. 2020:1–18. doi:10.1093/hropen/hoaa018.
 10. Ivashchenko T.E., Baranov V.S. Biohimicheskiye i molekulyarno-geneticheskiye osnovy patogeneza mukoviscidoza [Biochemical and molecular genetic basis of the cystic fibrosis pathogenesis]. *Intermedica*, St. Petersburg. 2002:256. (In Russ.)
 11. Furgeri D.T., Marson F.A.L., Correia C.A.A. et al. Cystic fibrosis transmembrane regulator haplotypes in households of patients with cystic fibrosis. *Gene*. 2018;30(641):137–143. doi: 10.1016/j.gene.2017.10.052.
 12. Petrova N.V., Kashirskaya N.Y., Vasilyeva T.A. et al. High frequency of complex CFTR alleles associated with c.1521_1523delCTT (F508del) in Russian cystic fibrosis patients. *BMC Genomics*. 2022;23:252. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08466-z>.
 13. Markova E.V., Tataru D.A. STR-markery hromosom, nesushchih mutacii F508del i CFTRdele2,3(21kb) gena CFTR. [STR markers of chromosomes carrying F508del and CFTRdele2,3(21kb) mutations of CFTR gene]. *Medicinskaya genetika [Medical genetics]*. 2017;16(6):9–20. (In Russ.)
 14. UCSC genome browser. <https://genome.ucsc.edu/index.html>
 15. WebSTR: a population-wide database of short tandem repeat variation in humans <http://webstr.ucsd.edu/>
 16. Markova E.V., Tataru D.A., Preda O.G. Fragmentnyy analiz polimorfizma (TG)mTn introna 8 gena CFTR. [CFTR fragment analysis of intron 8 (TG)mTn polymorphism.] *Medicinskaya genetika [Medical genetics]*. 2017; 16(1):11–19. (In Russ.)
 17. Kobler D., Modi H., Goldman B. Identification of an 11T allele in the polypyrimidine tract of intron 8 of the CFTR gene. *Genet Med*. 2006;8(2):125–8. doi:10.1097/01.gim.0000200217.85820.47.
 18. Chamayou S., Sicali M., Lombardo D. et al. Universal strategy for preimplantation genetic testing for cystic fibrosis based on next generation sequencing // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020: 37:213–222. doi.org/10.1007/s10815-019-01635-2.
 19. Dileria D., Amin P., Flores J. et al. Mutation profiling of the c.1521_1523delCTT (p.Phe508del, F508del) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator allele using haplotype-resolved long-read next generation sequencing. 2022. 43(5):595–603. doi: 10.1002/humu.24352.

References

1. Harper J.C., Wilton L., Traeger-Synodinos J. et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Human Reproduction Update*. 2012;18(3):234–247. doi:10.1093/humupd/dmr052.
2. van Montfoort A., Carvalho F., Coonen E. et al. ESHRE PGT Consortium data collection XIX–XX: PGT analyses from 2016 to 2017. *Human Reproduction Open*. 2021;00(0):1–10. doi:10.1093/hropen/hoab024.
3. Bazanov P.A., Gogolevsky P.A., Gogolevskaya I.K. et al. Pervye uspeшные rezultaty provedeniya v Rossii preimplantacionnoy geneticheskoy diagnostiki mukoviscidoza. [The first successful results of pre-