

Преимплантационное генетическое тестирование анеуплоидий: современное состояние, тренды и перспективы развития*

Лебедев И.Н.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики,
ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»,
Россия, 634050, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10

Профилактика хромосомных болезней через преимплантационную генетическую диагностику становится актуальным востребованным направлением современной репродуктивной медицины и генетики. Скрининг эмбрионов в рамках циклов экстракорпорального оплодотворения позволяет исключить перенос анеуплоидных бластоцист, обеспечивая повышение вероятности наступления беременности и рождения здорового ребенка, а также снижая риски репродуктивных потерь вследствие хромосомной патологии. В настоящем обзоре обсуждается современное состояние технологий преимплантационного генетического тестирования хромосомного статуса эмбрионов, сохраняющиеся в этой сфере проблемы, а также перспективные направления исследований, призванные дать решение возникающим вызовам.

Ключевые слова: анеуплоидия, преимплантационная генетическая диагностика, преимплантационный генетический скрининг, преимплантационное генетическое тестирование, хромосомные болезни, хромосомный мозаицизм, экстракорпоральное оплодотворение

Для цитирования: Лебедев И.Н. Преимплантационное генетическое тестирование анеуплоидий: современное состояние, тренды и перспективы развития. *Медицинская генетика* 2019; 18(3): 3-12.

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.03. 3-12

Автор для корреспонденции: Лебедев Игорь Николаевич, **e-mail:** igor.lebedev@medgenetics.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России.

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.02.2019

Preimplantation genetic testing for aneuploidy: state of the art, trends and perspectives

Lebedev I.N.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Science
Naberejnaya Ushaiki st., 10, Tomsk, 634050, Russia

Prevention of chromosomal diseases through preimplantation genetic testing is an edge issue of current reproductive medicine and genetics. Embryo testing during *in vitro* fertilization cycles is designed to eliminate the transfer of aneuploid blastocysts, providing an increased probability of the take home babies, as well as reducing the risks of reproductive losses due to chromosomal abnormalities. The current state of the preimplantation genetic testing, its trends and perspectives are discussed.

Key words: aneuploidy, *in vitro* fertilization, preimplantation genetic diagnosis, preimplantation genetic screening, preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A), chromosomal diseases, chromosomal mosaicism

For citation: Lebedev I.N. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: state of the art, trends and perspectives. *Medicinskaya genetika [Medical genetics]* 2019; 18(3): 3-12 (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.03. 3-12

Corresponding author: Lebedev Igor, **e-mail:** igor.lebedev@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 interest. Authors declare no conflict of interest.

Accepted: 15.02.2019

*Статья подготовлена по материалам доклада на научно-практической конференции «Новые аспекты пренатальной и преимплантационной генетической диагностики» (22 октября 2018 г., г. Томск).

Введение

Хромосомные болезни вносят значительный вклад в структуру врожденной и наследственной патологии человека, проявляясь, как правило, сложными комплексными аномалиями фенотипа. Большая часть хромосомных мутаций, в том числе анеуплоидий, обуславливающих развитие хромосомных заболеваний, элиминируется еще во внутриутробном периоде онтогенеза. Эпидемиологические данные свидетельствуют, что вероятность зачатия, вынашивания беременности и рождения здорового ребенка у женщин репродуктивного возраста составляет всего 30–40% в пределах одного менструального цикла [1]. Около 15–20% клинически распознаваемых беременностей спонтанно прерываются в первом триместре, при этом в среднем 50% потерь беременности сопровождаются хромосомными аномалиями, несовместимыми с нормальным эмбриональным развитием. Столь существенные показатели пренатального естественного отбора у человека демонстрируют еще одну клинически значимую сторону нарушений кариотипа, связанную с проблемами репродукции, бесплодия или невынашивания беременности. На решение этих проблем в значительной степени направлены вспомогательные репродуктивные технологии, которые в сочетании с молекулярными методами генетического тестирования эмбрионов призваны обеспечить перенос эмбрионов без хромосомной патологии, повышая тем самым вероятность наступления и вынашивания беременности. Технологии преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) эмбрионов на предмет анеуплоидий, начиная с 1991 г. и по настоящее время, претерпели ряд существенных модификаций, каждая из которых предлагала новое решение имеющихся в данной сфере репродуктивной медицины проблем. За этот период не раз изменялось и само название этих технологий: преимплантационная генетическая диагностика (PGD, ПГД), преимплантационный генетический скрининг (PGS, ПГС), а начиная с 2017 г. — ПГТ анеуплоидий (PGT-A). В настоящем обзоре в историческом контексте рассмотрено становление и развитие методов ПГТ анеуплоидий (не касаясь вопросов диагностики структурных перестроек хромосом), их современное состояние, а также остающиеся проблемы и возможные пути их преодоления.

Первое поколение технологий преимплантационного генетического тестирования анеуплоидий или PGD 1.0

ПГД — совокупность генетических и эмбриологических процедур, направленных на тестирование и от-

бор эмбрионов на преимплантационных этапах развития с целью исключения передачи будущему ребенку наследственных заболеваний или хромосомных аномалий еще до наступления беременности. Соответственно, появление методов ПГТ эмбрионов явилось результатом объединения достижений в области эмбриологии, цитологии и молекулярной цитогенетики, не говоря уже о прогрессе основополагающих для вспомогательных репродуктивных технологий медицинских дисциплин (гинекологии, эндокринологии и ряда других). В области эмбриологии ключевым моментом стало доказательство того, что биопсия одного или двух бластомеров на стадии 8-клеточной морулы на 3 день после оплодотворения *in vitro* не сказывается на способности эмбриона успешно продолжить дальнейшее развитие [2]. Соответственно, развитие микроманипуляционного оборудования и отработка метода биопсии бластомеров предоставили возможность получения клеточного материала для хромосомного анализа.

Вторым ключевым моментом стала адаптация метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) для анализа числа копий отдельных хромосом в интерфазных ядрах единичных бластомеров. Первоначально протокол такой гибридизации был опубликован Д. Гриффином с соавт. в 1991 г. и он касался гибридизации ДНК-зондов, специфичных к последовательностям половых хромосом, для исключения передачи потомству вовсе не хромосомных, а X-сцепленных заболеваний [3]. В дальнейшем сравнительно несложная процедура гибридизации приобрела популярность на фоне трудоемких попыток получения и дифференциального окрашивания метафазных пластинок из отдельных бластомеров методами индукции межвидовых гетерокарионов [4], либо химическими модификациями хроматина [5, 6]. Несмотря на то, что методики метафазного кариотипирования, разрабатываемые группой Ю.С. Верлинского в Институте репродуктивной генетики в Чикаго [7], обеспечивали возможность визуализации и анализа всех хромосом кариотипа человека, что было особенно ценно для детекции структурных перестроек, трудоемкость получения хромосомных препаратов оказалась критическим моментом для их рутинного применения в целях ПГД хромосомных заболеваний.

Соответственно, 90-е годы в области экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и ПГД прошли под эгидой FISH с использованием ДНК-зондов на 5 хромосом — 13, 18, 21, X и Y, анеуплоидия по которым имеет клинически значимый эффект, проявляясь рождением ребенка с классическими хромосомными заболеваниями — синдромами Патау, Эдвардса, Дауна, Шерешевского-Тернера, Клайнфельтера, трипло-Х. При этом гибридизация проводилась на бластомерах,

либо на полярных телах, что позволяло исключить хромосомную анеуплоидию мейотического происхождения, возникшую в оогенезе. Решенной задачей ПГС эмбрионов в то время явилось исключение переноса анеуплоидных по небольшому набору хромосом зародышей с целью профилактики распространенных хромосомных болезней у потомства. Стоит отметить, что методика тестирования первоначально подразумевала один раунд гибридизации ДНК-зондов, маркированных 5 различными флуорохромами. Однако, позднее встала задача расширить список тестируемых хромосом, включив в него дополнительно хромосомы, анеуплоидия по которым сопряжена с потерями беременности на ранних сроках. В связи с этим возникла дилемма относительно возможности одновременной детекции нескольких флуоресцентных сигналов с разными спектральными характеристиками в одном интерфазном ядре. В некоторых случаях получалось расширить список одновременно детектируемых зондов до 7–9 хромосом, включая дополнительно в анализ хромосомы 8, 15, 16, 22, анеуплоидия по которым ведет к невынашиванию беременности, либо в редких случаях в мозаичной форме совместима с живорождением. В некоторых исследованиях предлагались протоколы двух или даже трех-раундовой гибридизации, когда после первой гибридизации с некоторым набором ДНК-зондов проводилась денатурация ДНК и повторная гибридизация на том же самом бластомере [8]. Однако такие подходы в целом оказались не очень эффективными, поскольку качество гибридизационных сигналов, как правило, снижалось при увеличении числа денатураций хроматина. Кроме того, удлинялось время проведения анализа, что в то время оказывалось критичным для завершения диагностической процедуры в пределах идущего клинического цикла и своевременного переноса отобранного эмбриона для имплантации на 6 день после оплодотворения.

Технологии полнохромосомного скрининга в преимплантационной генетической диагностике или PGD2.0

Поскольку анеуплоидия по любой хромосоме набора является фактором риска невынашивания беременности или невозможности успешной имплантации бластоцисты, то с целью повышения эффективности процедур ЭКО стала понятной необходимость тестирования всех 24 хромосом одновременно, чего не мог обеспечить интерфазный FISH-анализ. Более того, стали накапливаться данные о высокой частоте хромосомного мозаицизма на стадии 8-клеточной морулы,

распространенность которого оценивалась на уровне 60% [9]. Соответственно, анализ одного-двух бластомеров по ограниченному числу хромосом оказывался явно не достаточным для характеристики хромосомной конституции целой бластоцисты, планируемой для переноса. Возникла потребность в использовании технологий полнохромосомного скрининга. Исторически первой такой технологией стала сравнительная геномная гибридизация (Comparative Genomic Hybridization, CGH).

Первоначально CGH была разработана в онкоцитогенетике, где также существовала проблема получения качественных хромосомных препаратов для изучения кариотипа клеток солидных опухолей [10]. Метод предполагал выделение геномной ДНК из опухолевой ткани, мечение ее определенным флуорохромом и гибридизацию на метафазных хромосомных пластинках здорового индивида совместно с контрольным образцом геномной ДНК из клеток с нормальным кариотипом, меченным другим красителем, и взятым в эквимольном количестве. В случае изменения числа копий отдельных хромосом или даже отдельных хромосомных регионов в опухолевых клетках относительно референсного генома специальное программное обеспечение позволяло оценить возникающие изменения профилей интенсивности флуоресценции обоих красителей, маркирующих тестируемый и контрольный образец ДНК. Таким образом, за один раунд гибридизации обеспечивалась возможность полного скрининга хромосомного набора на предмет всех числовых и несбалансированных хромосомных аномалий. При этом источником информации о кариотипе являлась геномная ДНК, а не метафазные хромосомы анализируемых клеток, а значит метод CGH отвечал всем вызовам, возникшим в то время в ПГС анеуплоидий. Однако до его первого применения в этих целях прошло 8 лет, что было связано с разработкой эффективных протоколов полногеномной амплификации ДНК единичной клетки [11]. Действительно, существенным отличием ПГД от остальных появившихся сфер применения сравнительной геномной гибридизации (онкоцитогенетика, пренатальная и постнатальная молекулярно-цитогенетическая диагностика хромосомных заболеваний) стало минимально возможное стартовое количество генетического материала для исследования, фактически представленное единственной молекулой ДНК в одном бластомере. Стоит отметить, что содержание ДНК в одном бластомере оценивается на уровне 6 пг, тогда как для эффективного проведения мечения и гибридизации в реакции CGH требуется не менее 1 нг ДНК.

Первое сообщение об успешном применении CGH для хромосомного анализа единичных blastomeres было опубликовано Д.Уэллсом и Д.Делхантом в 2000 г. [12]. С этого момента начался период полнохромосомного скрининга в ПГД, фактически продолжающийся до настоящего времени. Результаты первых диагностических исследований, проведенных методом CGH, продемонстрировали практически двукратное повышение эффективности циклов «ЭКО+ПГД» по сравнению с интерфазным FISH-анализом по таким показателям как частота имплантации на перенос и частота наступления беременности [13]. Кроме того, получаемые результаты расширили представления о частоте и разнообразии хромосомных анеуплоидий на преимплантационных этапах развития *in vitro*. Так, даже в первых небольших по объему исследованных выборках были зарегистрированы анеуплоидии по всем хромосомам, включая не только трисомии, характерные для спонтанных абортусов в первом триместре беременности, но и моносомии, а также неописанные ранее у человека нуллисомии хромосом [12–16]. Получил подтверждение факт высокой частоты хромосомного мозаицизма в 8-клеточных морулах, составившей от 38 до 58%. Наконец, впервые были описаны эмбрионы не просто с мозаичной, а с хаотичной хромосомной конституцией, когда различный спектр хромосомных анеуплоидий выявлялся в различных клетках. Частота таких эмбрионов варьировала от 8 до 17%.

Доля эмбрионов, имевших сбалансированный хромосомный набор, по данным CGH составляла 25–43%. Очевидно, что такие эмбрионы имели наилучшие шансы к имплантации и дальнейшему внутриутробному развитию. Интересно отметить, что этот диапазон достаточно хорошо согласуется с показателями вероятности наступления и вынашивания беременности (30–40% на один менструальный цикл), отмеченными ранее [1]. Таким образом, результаты полнохромосомного ПГТ фактически подтвердили гипотезу о ведущей роли хромосомного дисбаланса в ранней элиминации эмбрионов человека.

Дальнейшим ключевым моментом развития технологии CGH стал ее переход с метафазного анализа на микрочиповый формат (array-CGH, aCGH). Этому способствовала, прежде всего, низкая разрешающая способность метафазной CGH для диагностики микроструктурных перестроек хромосом в клинической практике. Появление aCGH в середине 2000-х годов произвело настоящую революцию в клинической цитогенетике: с этого момента технологии скрининга хромосомного дисбаланса одновременно стали и технологиями описания новых хромосомных му-

таций и синдромов. Кроме того, претерпела существенную реорганизацию и сама процедура исследования. Во-первых, анализ стал автоматизированным, выполняемым специализированным флуоресцентным сканером и программным обеспечением, не требующим от оператора работы с метафазными хромосомами. Во-вторых, сократилось время проведения исследования с 72 часов (при классической метафазной CGH) до 24 часов (при aCGH). Последнее обстоятельство оказалось в то время одним из решающих факторов, определивших востребованность aCGH в ПГД, поскольку метод обеспечивал полнохромосомный скрининг эмбрионов в пределах длящегося клинического цикла. Первое сообщение об успешном применении технологии aCGH для ПГС было опубликовано в 2006 г. группой исследователей из Университетской клиники г. Лёвена в Бельгии [17].

Однако, дальнейшее совершенствование технологий криоконсервации эмбрионов и обнаружение факта их лучшей имплантации по сравнению с эмбрионами, переносившимися в продолжающихся циклах, позволили сделать следующий важный шаг в развитии методов ПГТ, а именно, в циклах с криоконсервацией blastocyst появилась возможность осуществить диагностику на максимально поздних этапах преимплантационного развития, на 5–6-й день после оплодотворения. Этот факт имел решающее значение для ПГТ, поскольку к этому времени происходила естественная элиминация большей части blastocyst с хромосомными нарушениями. Кроме того, для тестирования стала доступной чуть большая часть клеток трофэктодермы, обычно до 6–10 клеток, что повышало эффективность молекулярно-генетических протоколов и обеспечивало лучшие возможности для выявления хромосомного мозаицизма. При обнаружении сбалансированного хромосомного набора в биоптате трофэктодермы, криоконсервированные blastocyst рекомендовались к переносу в следующем цикле. В таком виде технология ПГТ («aCGH в криоцикле») дошла до настоящего времени и продолжает использоваться во многих центрах в качестве ведущей диагностической процедуры. Единственной технической модификацией стало постепенное замещение aCGH более чувствительными к низкоуровневому хромосомному мозаицизму технологиями массового параллельного секвенирования (MPS). Их успешная адаптация к задачам анализа кариотипа единичных клеток состоялась на рубеже 2013–2014 гг. [18, 19], предопределив формирование лидирующих позиций MPS на современном рынке услуг в области ПГТ [20, 21].

Дискуссионные вопросы преимплантационного генетического тестирования или PGD3.0

Итак, стандартом ПГТ анеуплоидий в настоящее время является полнохромосомный скрининг биоптата трофэктодермы (в среднем 6—10 клеток), предпочтительно в криоциклах, с использованием технологий aCGH или MPS. Такой подход обеспечивает эффективный скрининг бластоцист на предмет числовых хромосомных нарушений, в том числе в мозаичной форме. Тем не менее нельзя сказать, что подобное молекулярное кариотипирование решает все задачи, стоящие перед ПГТ, и прежде всего задачи, связанные с высоким уровнем внутри- и межклеточного хромосомного мозаицизма на ранних этапах развития. Действительно, даже высокочувствительная детекция мозаичных анеуплоидий в биоптате трофэктодермы методом MPS не дает информации о кариотипе остальных клеток бластоцисты. Более того, кариотип трофэктодермы, и тем более ее фрагмента, не позволяет определить хромосомную конституцию внутренней клеточной массы, из которой впоследствии сформируется сам эмбрион.

В 2013 г. итальянским эмбриологом С. Палини во внутриполостной жидкости бластоцист была обнаружена внеклеточная ДНК (внДНК), которую ему удалось амплифицировать и использовать для aCGH, продемонстрировав присутствие анеуплоидий [22]. Эта находка привлекла внимание исследователей по ряду причин [23]. Если внДНК отражает хромосомную конституцию клеток бластоцисты, то можно ли с ее использованием разработать протокол малоинвазивной диагностики, минуя этап биопсии трофэктодермы? Тем более, что забор внутриполостной жидкости — стандартная процедура в некоторых протоколах криоконсервации бластоцист. Какие клетки являются источником внДНК — внутренней клеточной массы или трофэктодермы? Если внутренней клеточной массы, то впервые появляется источник информации о кариотипе клеток эмбриобласта. С другой стороны, если внДНК происходит из клеток бластоцисты, ушедших в апоптоз, то в какой степени молекулярное кариотипирование внДНК позволит получить информацию о хромосомном наборе клеток, оставшихся в составе бластоцисты? Очевидно, что поиск ответов на эти ключевые вопросы потребовал проведения специальных исследований. Такие исследования действительно были проведены, однако их результаты оказались весьма противоречивыми. Одни авторы продемонстрировали сравнительно высокую степень конкордантности результатов кариотипирования внДНК и клеток трофэк-

тодермы или отдельных бластомеров, достигающую 81—89% [24, 25], тогда как другие, напротив, сопоставив молекулярные кариотипы внДНК и целой бластоцисты, доступной для научного исследования, установили, что степень их соответствия составила только 48% [26]. Не исключено, что присутствие в составе проанализированных бластоцист клеток эмбриобласта понижало соответствие результатов за счет повышенной элиминации клеток с хромосомными аномалиями из внутренней клеточной массы в полость бластоцисты. Однако доказательств такой селекции клеток представлено не было, поскольку бластоцисты в этом исследовании анализировались без разделения на трофэктодерму и внутреннюю клеточную массу.

В своем исследовании, опубликованном в 2018 г., мы впервые разделили трофэктодерму и эмбриобласт (внутреннюю клеточную массу) 16 криоконсервированных бластоцист и сопоставили их кариотип с информацией, полученной путем MPS внДНК из бластоцеля [27]. Оказалось, что совпадение хромосомного набора, реконструированного по анализу внДНК, с клетками трофэктодермы и клеткам эмбриобласта составило только 40% и в том, и в другом случае. В то же время, соответствие кариотипов трофэктодермы и эмбриобласта наблюдалось в 85,7% бластоцист. Таким образом, следует признать, что использование внДНК в качестве единственного источника информации о кариотипе клеток бластоцисты вряд ли представляется возможным. В то же время биопсия клеток трофэктодермы достаточно точно отражает кариотип эмбриобласта, что является дополнительным обоснованием существующего на сегодняшний момент стандарта ПГТ анеуплоидий.

Интерес к поиску дополнительных источников информации о кариотипе клеток бластоцисты не ограничился изучением только внДНК в ее полости. Оказалось, что внДНК присутствует и в среде, в которой проводится культивирование эмбрионов. А раз так, то перед исследователями впервые появился шанс разработать метод действительно неинвазивного тестирования эмбрионов, в отличие от малоинвазивной процедуры бластоцентеза [28]. Однако перед исследователями возникла та же самая задача — определить источники внДНК в культуральной среде и установить степень ее соответствия хромосомному набору клеток бластоцисты, а еще лучше внутренней клеточной массы. В пока еще небольшом числе опубликованных исследований точно также, как и при анализе внДНК из полости бластоцисты, были получены противоречивые результаты. Соответствие молекулярных кариотипов внДНК из культуральной среды и биоптатов трофэктодермы варьировало в диапазоне от 27% [29] до

85,7% [30]. Интересно, что высокий разброс степени конкордантности результатов сохранился и в результатах трех исследований, опубликованных в 2018 г., в которых для сравнения с кариотипом клеток трофэктодермы использовались комбинированные данные о внДНК, полученной как из культуральной среды, так и из полости бластоцисты. В одном из исследований степень соответствия кариотипов составила только 37,5% [31], тогда как в двух других работах она находилась в диапазоне от 75% [32] до 87,5% [33].

На фоне попыток совершенствования технологий ПГТ и повышения его информативности самостоятельную фундаментальную проблему представляет вопрос о том, не является ли столь высокий уровень хромосомных аномалий и мозаицизма, регистрируемый в бластоцистах *in vitro*, следствием влияния условий культивирования гамет и эмбрионов на стабильность их хромосомного набора. Действительно, исследования на модельных животных показывают, что такой эффект может иметь место [34]. Но для человека такие данные долгое время оставались недоступны. В 2018 г. на ежегодной конференции Европейского общества репродукции человека и эмбриологии (ESHRE) был представлен доклад научной группы под руководством С. Мунне, в котором впервые были представлены предварительные результаты продолжающегося исследования по генетическому тестированию бластоцист, полученных *in vivo* [35]. Изучить такой уникальный материал стало возможным с совершенствованием аппаратуры для получения бластоцист с использованием маточного лаважа. Дизайн проводимого исследования включал следующие основные этапы: 1) минимальная стимуляция овуляции; 2) внутриматочная инсеминация; 3) получение маточного лаважа на 5 день после оплодотворения; 4) биопсия бластоцист с их последующей криоконсервацией; 5) ПГТ; 6) получение результата; 7) консультирование семьи и принятие решения о переносе бластоцисты.

Предварительные результаты исследования оказались неожиданными. Так, согласно опубликованным тезисам доклада, среди 29 проанализированных бластоцист только 27,5% оказались эуплоидными, 21% бластоцист имели анеуплоидный кариотип, 17% были мозаичными, а 27,5% несли комплексные хромосомные аномалии [35]. В докладе на конференции были озвучены данные относительно кариотипа уже 73 бластоцист в сравнении с собственными результатами, полученными при тестировании свыше 100000 бластоцист после циклов ЭКО *in vitro*. Доля бластоцист с эуплоидным кариотипом увеличилась до 36%, тем не менее она оказалась заметно ниже аналогичного показателя в группе бластоцист *in vitro*, составившего 59%

[Munne S. с соавт., 2018, персональное сообщение]. Частота анеуплоидных бластоцист заметно не отличалась и составила 15 и 18% в группах бластоцист *in vivo* и *in vitro*, соответственно. Примечательно, что среди бластоцист *in vivo* была отмечена заметно более высокая частота низкоуровневого хромосомного мозаицизма с частотой анеуплоидной клеточной линии ниже 40% (21 и 10%, соответственно), при этом доля бластоцист с высоким уровнем мозаицизма (более 40% анеуплоидных клеток), была сопоставимой в обеих группах (8 и 6%, соответственно). Еще одним неожиданным результатом оказалась заметно повышенная частота комплексных хромосомных аномалий в бластоцистах *in vivo* (20%), по сравнению с бластоцистами *in vitro* (7%).

Предварительный характер приведенных результатов еще не завершеного исследования не позволяет сделать строгих научных выводов. Тем не менее, на две тенденции следует обратить внимание. Во-первых, в естественных циклах частота эуплоидных эмбрионов, по-видимому, не повышена относительно циклов ЭКО. Здесь, однако, нельзя полностью исключить эффектов гормональной гиперстимуляции яичников, имеющей место в обоих вариантах, на стабильность кариотипа. Во-вторых, бластоцисты, полученные *in vivo*, также характеризуются мозаичными хромосомными аномалиями, преимущественно в небольшом проценте клеток (низкоуровневый хромосомный мозаицизм). Не исключено, что процесс нормального преимплантационного развития эмбрионов человека в естественных циклах также сопровождается индукцией хромосомного мозаицизма. Очевидно, что биологическую значимость такого феномена еще только предстоит изучить. Однако уже сейчас этот факт становится одним из важных теоретических аргументов, позволяющих объяснить неожиданный успех еще одного недавно возникшего направления в ПГТ анеуплоидий, связанного с переносом для имплантации мозаичных анеуплоидных бластоцист [36–38].

Как часто случалось в истории ПГД, ее технологии внедрялись в практику, не получив предварительного надежного теоретического обоснования. Причина такого парадокса кроется в том, что получить фундаментальные научные данные в этой области можно только на основании результатов собственно диагностических процедур. Так произошло и в случае с переносом мозаичных эмбрионов. Основанием же для решения о переносе бластоцист с мозаичным кариотипом стала развернувшаяся дискуссия о низкой эффективности ПГТ анеуплоидий в сравнении с циклами ЭКО, где такого тестирования не проводилось вовсе [39, 40].

Действительно, постепенно с накоплением данных об исходах циклов ЭКО стала появляться информация

об эффективности циклов с ПГТ анеуплоидий и без него. Как оказалось, результаты такого сравнения не являются однозначными. Так, в одном из эпидемиологических исследований, проведенном в США, частота родов в расчете на один перенос в циклах без ПГС ($n=97069$) составила 46,2%, тогда как в циклах с ПГС ($n=5471$) только 39,3%, причем эти отличия оказались статистически значимыми ($p<0,0001$) [41]. Более того, проведение ПГС не влияло и на частоту спонтанных потерь беременности — 13,7% в циклах с ПГС и 13,9% без ПГС ($p=0,8507$). Когда исследуемые группы стратифицировали по возрасту женщин, то оказалось, что выявленные закономерности справедливы для женщин до 35 лет. Что же касается женщин старше 37 лет, то применение ПГС действительно снижало вероятность потери беременности с 26 до 16,8% ($p<0,0001$) и увеличивало вероятность рождения здорового ребенка с 30,4 до 33,3% ($p=0,02$). Иными словами, эффективность ПГТ эмбрионов на предмет анеуплоидии в циклах ЭКО оказалась значимой только для женщин старшей возрастной группы. Для молодых женщин тестирование эмбрионов не увеличивало шансов на успех процедуры.

На фоне таких заключений об особенностях эффектов ПГС в разных возрастных группах развернулась дискуссия о целесообразности использования генетического тестирования на предмет анеуплоидии в циклах ЭКО, особенно если речь идет о молодых супружеских парах [42]. Высказывались мнения, что биопсия трофобласта может все-таки иметь негативные последствия для дальнейшего развития эмбриона, при этом многое в исходе данной процедуры определяется опытом и компетенцией эмбриолога, проводящего микроманипуляции с бластоцистой. Кроме того, выявление хромосомного мозаицизма в биоптате трофобласта вовсе не исключает наличия нормального кариотипа в клетках эмбриобласта. А раз так, то существует некоторый риск исключения из переноса жизнеспособных эмбрионов с нормальным хромосомным набором.

Как итог таких дискуссий в 2015 г. появилось первое сенсационное сообщение о рождении здоровых детей с нормальным кариотипом после переноса мозаичных анеуплоидных эмбрионов [36]: 6 из 18 перенесенных мозаичных бластоцист развились в нормальных эмбрионов и все 6 беременностей завершились рождением здоровых девочек с кариотипом 46,XX. Примечательно, что все 6 бластоцист на момент переноса имели в своем составе мозаичные формы моносомий по хромосомам 2 (две бластоцисты) или 5, а также двойных моносомий по хромосомам 4 и 10; 6 и 15; 5 и 7 с долей анеуплоидной клеточной линии от 35 до 50%.

Сама по себе каждая из этих моносомий не совместима с нормальным течением эмбриогенеза и приводит к остановке развития уже на преимплантационных этапах. Однако в случае мозаичного кариотипа, присутствие клеток с нормальным хромосомным набором может способствовать нормальному развитию, особенно если анеуплоидные клеточные линии ограничены трофобластом, не вносящий вклад в формирование эмбриональных структур. Интересно, что частота успешных родов в расчете на один перенос в настоящем исследовании — 30% (6/18) оказалась фактически сопоставимой с аналогичным показателем в рассмотренном выше эпидемиологическом исследовании [41] — 30,4% для женщин старше 37 лет, которым не проводилось ПГТ анеуплоидий в циклах ЭКО.

Позднее в 2018 г. той же группой авторов было сообщено, что эффективность переноса мозаичных бластоцист с долей анеуплоидных клеток менее 50% статистически значимо не отличается от переноса эуплоидных эмбрионов по таким показателям, как частота имплантации, частота успешных родов и частота потерь беременности [38]. Однако если доля анеуплоидных клеток более 50%, то это ведет к резкому снижению частоты имплантации и частоты родов, однако по-прежнему не влияет на вероятность невынашивания беременности.

В 2016 г. Международное общество по ПГД (PGDIS) опубликовало специальные рекомендации по генетическому тестированию и переносу мозаичных бластоцист [43]. Согласно данным рекомендациям, приоритетны для переноса мозаичные формы аутосомных моносомий. Перенос мозаичных трисомий также допускается, за исключением трисомий, совместимых с живорождением (трисомии хромосом 13, 18 и 21), вызывающих задержку внутриутробного развития плода (трисомии 2, 7 и 16), а также приводящих, в случае коррекции, к формированию однородительской дисомии и болезням геномного импринтинга (трисомии 14 и 15).

В любом случае перенос мозаичных бластоцист остается в настоящее время дискуссионным. С одной стороны, он дает шанс на рождение ребенка в ситуациях, когда в цикле ЭКО получено минимальное число бластоцист, среди которых нет ни одной с эуплоидным кариотипом. С другой стороны, еще не достаточно сведений о механизмах индукции хромосомного мозаицизма и элиминации анеуплоидных клеток в ходе развития. А раз так, то перенос мозаичных эмбрионов может быть сопряжен с риском формирования однородительских дисомий и болезней геномного импринтинга у потомства, с гомозиготизацией рецессивных мутаций в генах наследственных болезней, с возникновением гонадного мо-

заицизма, с нарушением равновероятной инактивации X-хромосомы у плодов женского пола. Минимизировать эти риски можно, учитывая цитогенетические механизмы формирования хромосомного мозаицизма в раннем эмбриональном развитии [44]. Так, наименьшее негативное влияние на ход эмбриогенеза оказывают мозаичные хромосомные аномалии, возникшие вследствие *de novo* митотической ошибки сегрегации хромосом на постзиготических этапах развития. Такая ошибка приведет к формированию трисомной и моносомной клеток в случае хромосомного нерасхождения и затронет, как правило, небольшую популяцию клеток развивающегося эмбриона. В случае же хромосомного отставания возникнет моносомная клетка на фоне основной массы клеток с нормальным кариотипом. Вероятно, именно поэтому мозаичные формы аутосомных моносомий демонстрируют наилучшие показатели исходов циклов ЭКО в случае переноса. В случае же коррекции трисомии мейотического происхождения могут возникнуть либо тетрасомная и дисомная клетки (при хромосомном нерасхождении), либо дисомная клетка (при хромосомном отставании). И в том и в другом случае есть риск формирования однородительского наследования хромосом. Кроме того, присутствие трисомии мейотического происхождения в зиготе нарушает запуск всей программы эмбрионального развития.

Соответственно, для снижения генетического риска при переносе мозаичных бластоцист важно знать происхождение хромосомного мозаицизма и самой хромосомной аномалии, представленной в мозаичном состоянии – возникла ли она вследствие хромосомного нерасхождения в мейозе у одного из родителей, либо сформировалась в результате постзиготической митотической ошибки. Нами в ходе сравнительного анализа кариотипа клеток бластоцисты и вДНК в ее полости был описан феномен реципрокных анеуплоидий, представленных в пределах одной бластоцисты трисомией и моносомией по одной и той же паре гомологичных хромосом [27, 45]. Единственным теоретически возможным механизмом формирования реципрокной анеуплоидии с сочетанием трисомных и моносомных клеток является *de novo* хромосомное нерасхождение на постзиготических этапах развития. Соответственно, обнаружение реципрокной анеуплоидии при сравнительном молекулярном кариотипировании биоптата трофэктодермы и образца вДНК из полости бластоцисты (или из культуральной среды) позволяет маркировать происхождение мозаичного кариотипа. Таким образом, если сама по себе вДНК не может рассматриваться в настоящее время в качестве

единственного источника информации о кариотипе эмбриона, то ее анализ в комбинации с биопсией трофэктодермы может оказаться важным инструментом, позволяющим минимизировать генетические риски, возникающие при переносе мозаичных бластоцист.

Заключение

На протяжении почти 20 лет своего существования ПГТ анеуплоидий в рамках циклов ЭКО прошло путь от выявления изменений в числе копий отдельных хромосом в единичных бластомерах до масштабного полнохромосомного скрининга, осуществляемого современными технологиями aCGH или MPS. За прошедшие годы сформулированы показания для проведения генетического тестирования эмбрионов, равно как и обозначены те ситуации, в которых скрининг анеуплоидий оказывается неэффективным и не ведет к существенному улучшению эффективности циклов ЭКО. Следует отметить, что далеко не все методологические и теоретические вопросы в данной сфере медицинской генетики и репродуктивной медицины остаются решенными, но это стимулирует, в свою очередь, появление новых перспективных направлений исследований, включая неинвазивное преимплантационное тестирование или перенос мозаичных эмбрионов.

Список литературы

1. Macklon N.S., Geraedts J.P., Fauser B.C. Conception to ongoing pregnancy: the «black box» of early pregnancy loss. *Hum Reprod Upd.* 2002;8(4):333-343.
2. Hardy K. et al. Human preimplantation development *in vitro* is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod.* 1990. 5(6):708-714.
3. Griffin D.K. et al. Fluorescent in-situ hybridization to interphase nuclei of human preimplantation embryos with X and Y chromosome specific probes. *Hum Reprod.* 1991;6(1):101-105.
4. Verlinsky Y. et al. Nuclear transfer for full karyotyping and preimplantation diagnosis for translocations. *Reprod Biomed Online.* 2002;5(3):300-305.
5. Shkumatov A. et al. Obtaining metaphase spreads from single blastomeres for PGD of chromosomal rearrangements. *Reprod Biomed Online.* 2007;14(4):498-503.
6. Kuliev A. et al. Conversion and non-conversion approach to preimplantation diagnosis for chromosomal rearrangements in 475 cycles. *Reprod Biomed Online.* 2010;21(1):93-99.
7. Verlinsky Y., Dozortsev D., Evsikov S. Visualization and cytogenetic analysis of second polar body chromosomes following its fusion with a one-cell mouse embryo. *J Assist Reprod Genet.* 1994;11(3):123-131.
8. Ren X.L. et al. Analysis of chromosome mosaicism in preimplantation embryos by using 2 sequential rounds of fluorescence *in situ* hybridization. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2007;24(6): 706-708.
9. Los FJ, Van Opstal D, van den Berg C. The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model. *Hum Reprod Update.* 2004;10(1):79-94.

10. Kallioniemi A. et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258(5083):818-821.
11. Лебедев И.Н., Черемных А.Д., Назаренко С.А., Светлаков А.В. Полногеномная амплификация ДНК: современные достижения и перспективы использования в преимплантационной генетической диагностике. *Проблемы репродукции*. 2005; 11(5):60-67.
12. Wells D., Delhanty J.D.A. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod*. 2000;6(11):1055-1062.
13. Wilton L. et al. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence *in situ* hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril*. 2003;80(4):860-868.
14. Voullaire L., Slater H., Williamson R., Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet*. 2000;106(2):210-217.
15. Malmgren H. et al. Single cell CGH analysis reveals a high degree of mosaicism in human embryos from patients with balanced structural chromosomal aberrations. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(5):502-510.
16. Trussler J.L., Pickering S.J., Oglivie C.M. Investigation of chromosomal imbalance in human embryos using comparative genomic hybridization. *Reprod Biomed Online*. 2004;8(6):701-711.
17. Le Caignec C. et al. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(9):e68.
18. Zhang C. et al. A single cell level based method for Copy Number Variation analysis by low coverage massively parallel sequencing. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e54236.
19. Wells D. et al. Clinical utilization of a rapid low-pass whole genome sequencing technique for the diagnosis of aneuploidy in human embryos prior to implantation. *J Med Genet*. 2014;51(8):553-562.
20. Munne S., Wells D. Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil Steril*. 2017;107(5):1085-1091.
21. Wei S. et al. Rapid preimplantation genetic screening using a handheld, nanopore-based DNA sequencer. *Fertil Steril*. 2018;110(5):910-916.
22. Palini S. et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reprod Biomed Online*. 2013;26(6):603-610.
23. Жигалина Д.И. и др. Преимплантационная генетическая диагностика на основе бластоцентеза: проблемы и перспективы. *Генетика*. 2016;52(1):5-13.
24. Gianaroli L. et al. Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study. *Fertil Steril*. 2014;102(6):1692-1696.
25. Magli M.C. et al. Preimplantation genetic testing: polar bodies, blastomeres, trophoctoderm cells, or blastocoele fluid? *Fertil Steril*. 2016;105(3):676-683.
26. Tobler K.J. et al. Blastocoele fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis. *Fertil Steril*. 2015;104(2):418-425.
27. Tsuboi O. et al. Karyotype of the blastocoele fluid demonstrate low concordance with both trophoctoderm and inner cell mass. *Fertil Steril*. 2018;109(6):1127-1134.
28. Shamonki M.I., Jin H., Haimowitz Z., Liu L. Proof of concept: preimplantation genetic screening without biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertil Steril*. 2016;106(6):1312-1318.
29. Feichtinger M. et al. Non-invasive preimplantation genetic screening using array comparative genomic hybridization on spent culture media: a proof-of-concept pilot study. *Reprod. Biomed. Online*. 2017;34(6):583-539.
30. Xu J. et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for *in vitro* fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(42):11907-11912.
31. Capalbo A. et al. Diagnostic efficacy of blastocoele fluid and spent media as sources of DNA for preimplantation genetic testing in standard clinical conditions. *Fertil Steril*. 2018;110(5):870-879.
32. Li P. et al. Preimplantation genetic screening with spent culture medium/blastocoele fluid for *in vitro* fertilization. *Sci Rep*. 2018;8(1):9275.
33. Kuznetsov V. et al. Evaluation of a novel non-invasive preimplantation genetic screening approach. *PLoS ONE*. 2018;13(5):e0197262.
34. Tsuboi O. et al. Genome stability of bovine *in vivo*-conceived cleavage-stage embryos is higher compared to *in vitro*-produced embryos. *Hum Reprod*. 2017;32(11):2348-2357.
35. Munne S. et al. Pre-implantation genetic screening (PGS) of *in vivo* conceived and developed blastocysts recovered by lavage: Preliminary experience. *Hum Reprod*. 2018;33(Suppl):i119.
36. Greco E., Minasi M.G., Fiorentino F. Healthy babies after intrauterine of mosaic aneuploid blastocysts. *N Engl J Med*. 2015;373(21):2089-2090.
37. Munne S. et al. Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil Steril*. 2017;108(1):62-71.
38. Spinella F. et al. Extent of chromosomal mosaicism influences the clinical outcome of *in vitro* fertilization treatments. *Fertil Steril*. 2018;109(1):77-83.
39. Gleicher N., Orvieto R. Is the hypothesis of preimplantation genetic screening (PGS) still supportable? A review. *J Ovarian Res*. 2017;10(1):21.
40. Paulson R.J. Preimplantation genetic screening: what is the clinical efficiency? *Fertil Steril*. 2017;108(2):228-230.
41. Kushnir V.A. et al. Effectiveness of *in vitro* fertilization with preimplantation genetic screening: a reanalysis of United States assisted reproductive technology data 2011-2012. *Fertil Steril*. 2016;106(1):75-79.
42. Munne S. Status of preimplantation genetic testing and embryo selection. *Reprod Biomed Online*. 2018;37(4):393-396.
43. PGDIS position statement on chromosome mosaicism and preimplantation aneuploidy testing at the blastocysts stage. www.pgdis.org/docs/newsletter_071816.html
44. Lebedev I. Mosaic aneuploidy in early fetal losses. *Cytogenet Genome Res*. 2011;133(2-4):169-183.
45. Жигалина Д.И. и др. Сравнительная цитогенетика эмбриобласта, трофэктодермы и внутриполостной жидкости бластоцисты человека. *Медицинская генетика*. 2018;17(2):46-52.

Referenses

1. Macklon N.S., Geraedts J.P., Fauser B.C. Conception to ongoing pregnancy: the «black box» of early pregnancy loss. *Hum Reprod Upd*. 2002;8(4):333-343.
2. Hardy K. et al. Human preimplantation development *in vitro* is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod*. 1990; 5(6):708-714.
3. Griffin D.K. et al. Fluorescent *in-situ* hybridization to interphase nuclei of human preimplantation embryos with X and Y chromosome specific probes. *Hum Reprod*. 1991;6(1):101-105.
4. Verlinsky Y. et al. Nuclear transfer for full karyotyping and preimplantation diagnosis for translocations. *Reprod Biomed Online*. 2002;5(3):300-305.
5. Shkumatov A. et al. Obtaining metaphase spreads from single blastomeres for PGD of chromosomal rearrangements. *Reprod Biomed Online*. 2007;14(4):498-503.
6. Kuliev A. et al. Conversion and non-conversion approach to preimplantation diagnosis for chromosomal rearrangements in 475 cycles. *Reprod Biomed Online*. 2010;21(1):93-99.
7. Verlinsky Y., Dozortsev D., Evsikov S. Visualization and cytogenetic analysis of second polar body chromosomes following its fusion with a one-cell mouse embryo. *J Assist Reprod Genet*. 1994;11(3):123-131.

8. Ren X.L. et al. Analysis of chromosome mosaicism in preimplantation embryos by using 2 sequential rounds of fluorescence in situ hybridization. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2007;24(6): 706-708.
9. Los FJ, Van Opstal D, van den Berg C. The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model. *Hum Reprod Update*. 2004;10(1):79-94.
10. Kallioniemi A. et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258(5083):818-821.
11. Lebedev I.N., Cheremnykh A.D., Nazarenko S.A., Svetlakov A.V. Polnogenomnaya amplifikatsiya DNK: sovremennyye dostizheniya i perspektivy ispol'zovaniya v preimplantatsionnoy geneticheskoy diagnostike [Genome-wide DNA amplification: current advances and prospects for use in preimplantation genetic diagnostics]. *Problemy reproduktivnoy [Reproduction problems]*. 2005; 11 (5): 60-67. (In Rus)
12. Wells D., Delhanty J.D.A. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod*. 2000;6(11):1055-1062.
13. Wilton L. et al. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril*. 2003;80(4):860-868.
14. Voullaire L., Slater H., Williamson R., Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet*. 2000;106(2):210-217.
15. Malmgren H. et al. Single cell CGH analysis reveals a high degree of mosaicism in human embryos from patients with balanced structural chromosomal aberrations. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(5):502-510.
16. Trussler J.L., Pickering S.J., Oglivie C.M. Investigation of chromosomal imbalance in human embryos using comparative genomic hybridization. *Reprod Biomed Online*. 2004;8(6):701-711.
17. Le Caignec C. et al. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(9):e68.
18. Zhang C. et al. A single cell level based method for Copy Number Variation analysis by low coverage massively parallel sequencing. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e54236.
19. Wells D. et al. Clinical utilization of a rapid low-pass whole genome sequencing technique for the diagnosis of aneuploidy in human embryos prior to implantation. *J Med Genet*. 2014;51(8):553-562.
20. Munne S., Wells D. Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil Steril*. 2017;107(5):1085-1091.
21. Wei S. et al. Rapid preimplantation genetic screening using a handheld, nanopore-based DNA sequencer. *Fertil Steril*. 2018;110(5):910-916.
22. Palini S. et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reprod Biomed Online*. 2013;26(6):603-610.
23. Zhigalina D.I. et al. Preimplantatsionnaya geneticheskaya diagnostika na osnove blastotsenteza: problemy i perspektivy [Preimplantation genetic diagnosis based on blastocentesis: problems and perspectives]. *Genetika [Genetics]*. 2016; 52 (1): 5-13. (In Rus)
24. Gianaroli L. et al. Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study. *Fertil Steril*. 2014;102(6):1692-1696.
25. Magli M.C. et al. Preimplantation genetic testing: polar bodies, blastomeres, trophoctoderm cells, or blastocoele fluid? *Fertil Steril*. 2016;105(3):676-683.
26. Tobler K.J. et al. Blastocoele fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis. *Fertil Steril*. 2015;104(2):418-425.
27. Tsuiko O. et al. Karyotype of the blastocoele fluid demonstrate low concordance with both trophectoderm and inner cell mass. *Fertil Steril*. 2018;109(6):1127-1134.
28. Shamonki M.I., Jin H., Haimowitz Z., Liu L. Proof of concept: preimplantation genetic screening without biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertil Steril*. 2016;106(6):1312-1318.
29. Feichtinger M. et al. Non-invasive preimplantation genetic screening using array comparative genomic hybridization on spent culture media: a proof-of-concept pilot study. *Reprod. Biomed. Online*. 2017;34(6): 583-539.
30. Xu J. et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(42):11907-11912.
31. Capalbo A. et al. Diagnostic efficacy of blastocoele fluid and spent media as sources of DNA for preimplantation genetic testing in standard clinical conditions. *Fertil Steril*. 2018;110(5):870-879.
32. Li P. et al. Preimplantation genetic screening with spent culture medium/blastocoele fluid for in vitro fertilization. *Sci Rep*. 2018;8(1):9275.
33. Kuznetsov V. et al. Evaluation of a novel non-invasive preimplantation genetic screening approach. *PLoS ONE*. 2018;13(5):e0197262.
34. Tsuiko O. et al. Genome stability of bovine in vivo-conceived cleavage-stage embryos is higher compared to in vitro-produced embryos. *Hum Reprod*. 2017;32(11):2348-2357.
35. Munne S. et al. Pre-implantation genetic screening (PGS) of in vivo conceived and developed blastocysts recovered by lavage: Preliminary experience. *Hum Reprod*. 2018;33(Suppl):i119.
36. Greco E., Minasi M.G., Fiorentino F. Healthy babies after intrauterine of mosaic aneuploid blastocysts. *N Engl J Med*. 2015;373(21):2089-2090.
37. Munne S. et al. Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil Steril*. 2017;108(1):62-71.
38. Spinella F. et al. Extent of chromosomal mosaicism influences the clinical outcome of in vitro fertilization treatments. *Fertil Steril*. 2018;109(1):77-83.
39. Gleicher N., Orvieto R. Is the hypothesis of preimplantation genetic screening (PGS) still supportable? A review. *J Ovarian Res*. 2017;10(1):21.
40. Paulson R.J. Preimplantation genetic screening: what is the clinical efficiency? *Fertil Steril*. 2017;108(2):228-230.
41. Kushnir V.A. et al. Effectiveness of in vitro fertilization with preimplantation genetic screening: a reanalysis of United States assisted reproductive technology data 2011-2012. *Fertil Steril*. 2016;106(1):75-79.
42. Munne S. Status of preimplantation genetic testing and embryo selection. *Reprod Biomed Online*. 2018;37(4):393-396.
43. PGDIS position statement on chromosome mosaicism and preimplantation aneuploidy testing at the blastocysts stage. www.pgdis.org/docs/newsletter_071816.html
44. Lebedev I. Mosaic aneuploidy in early fetal losses. *Cytogenet Genome Res*. 2011;133(2-4):169-183.
45. Zhigalina D.I. et al. Sravnitel'naya tsitogenetika embrioblasta, trofektodermiy i vnutripolostnoy zhidkosti blastotsisty cheloveka [Comparative cytogenetics of the embryoblast, trophoctoderm and blastocoele fluid of the human blastocyst]. *Medicinskaya genetika [Medical genetics]*. 2018; 17 (2): 46-52 (In Rus)