

НЕИНВАЗИВНОЕ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ НА АНЕУПЛОИДИИ

О. И. Лисицына[✉], А. Н. Екимов, Е. Е. Атапина, А. Г. Сыркашева, Е. Г. Горяйнова, Н. П. Макарова, Д. Ю. Трофимов, Н. В. Долгушина

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

В настоящее время в мире идет активная работа по оптимизации применения подходов к определению хромосомной патологии эмбрионов. Целью исследования было оценить возможность использования неинвазивного преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии (ниПГТ-А) путем анализа внеклеточной ДНК в отработанной культуральной среде (ОКС). Проведено ниПГТ-А анеуплоидных эмбрионов путем анализа внеклеточной ДНК в ОКС. Все blastocysts были анеуплоидными по результатам предшествующего преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии (ПГТ-А) с биопсией трофобласта (ТФЭ). В исследование было включено 11 эмбрионов от семи супружеских пар. Все эмбрионы размораживали и культивировали в каплях по 10 мкл в течение 9 ч. Весь объем ОКС собирали и анализировали путем ниПГТ-А. Полученные результаты сравнивали на соответствие с предшествующими данными по ПГТ-А. Суммарно выполнили анализ 12 образцов ОКС: 11 образцов, в которых были культивированы эмбрионы, и один контрольный образец. В одном случае (9,1%) из 11 были получены хаотичные результаты по данным ниПГТ-А, не позволяющие провести диагностику состояния кариотипа. Полное соответствие результатов ПГТ-А и ниПГТ-А получено в семи случаях из 10 (70%), клиническое соответствие результатов — в девяти случаях из 10 (90%). В одном случае (10%) по данным ниПГТ-А кариотип blastocysts был диагностирован как эуплоидный. Вывод: ниПГТ-А может быть перспективным, не требующим биопсии, методом диагностики хромосомного статуса преимплантационных эмбрионов.

Ключевые слова: неинвазивное преимплантационное генетическое тестирование, неинвазивное ПГТ-А, ниПГТ-А, ПГТ-А, отработанная культуральная среда, ОКС, биопсия трофобласта, анеуплоидия, внеклеточная ДНК

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №23-25-00346.

Вклад авторов: Н. П. Макарова, О. И. Лисицына, Н. В. Долгушина — концепция и дизайн исследования; О. И. Лисицына, Н. П. Макарова, Н. В. Долгушина, А. Г. Сыркашева, А. Н. Екимов — написание и редактирование текста; О. И. Лисицына — статистическая обработка результатов; Е. Г. Горяйнова, Н. П. Макарова — сбор биологического материала; А. Н. Екимов, Е. Е. Атапина — лабораторный этап; Н. В. Долгушина, Д. Ю. Трофимов — утверждение публикации.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова» (протокол № 10 от 28 октября 2021 г.). Пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Игоревна Лисицына
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; o_yazykova@inbox.ru

Статья получена: 18.06.2023 **Статья принята к печати:** 09.08.2023 **Опубликована онлайн:** 30.08.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.034

NONINVASIVE PREIMPLANTATION GENETIC TESTING FOR ANEUPLOIDY

Lisitsyna OI[✉], Ekimov AN, Atapina EE, Syrkasheva AG, Goryainova EG, Makarova NP, Trofimov DYU, Dolgushina NV

Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

To date the world community is actively working to optimize the approaches to determining chromosomal abnormalities in embryos. The study was aimed to assess the possibility of using noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy (niPGT-A) through analysis of cell-free DNA in spent culture medium (SCM). We conducted niPGT-A of aneuploid embryos by analysis of cell-free DNA in SCM. All blastocysts were considered to be aneuploid based on the results of previous preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) with trophoctoderm (TE) biopsy. The study involved 11 embryos from seven couples. All the embryos were warmed and individually cultured in the 10 µL drops for 9 h. All SCM was collected and analyzed by niPGT-A. The results obtained were tested for concordance with previous PGT-A data. A total of 12 SCM samples were assessed: 11 samples, in which the embryos were cultured, and one control sample. Chaotic niPGT-A results not allowing the karyotype diagnosis were obtained in one case (9.1%) out of 11. Full concordance of the PGT-A and niPGT-A results was revealed in seven cases out of 10 (70%), while clinical concordance was found in nine cases out of 10 (90%). In one case (10%), the blastocyst was considered to have euploid karyotype based on the niPGT-A data. It has been concluded that niPGT-A can be a promising method of preimplantation embryonal chromosomal status diagnosis that requires no biopsy.

Keywords: noninvasive preimplantation genetic testing, noninvasive PGT-A, niPGT-A, PGT-A, spent culture medium, SCM, trophoctoderm biopsy, aneuploidy, cell-free DNA

Funding: the study was supported by the Russian Foundation for Basic Research under research project №23-25-00346.

Author contribution: Makarova NP, Lisitsyna OI, Dolgushina NV — study concept and design; Lisitsyna OI, Makarova NP, Dolgushina NV, Syrkasheva AG, Ekimov AN — manuscript writing and editing; Lisitsyna OI — statistical processing of the results; Goryainova EG, Makarova NP — biomaterial collection; Ekimov AN, Atapina EE — laboratory phase; Dolgushina NV, Trofimov DYU — publication approval.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (protocol № 10 of 28 October 2021). The patients submitted the informed consent to study participation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga I. Lisitsyna
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; o_yazykova@inbox.ru

Received: 18.06.2023 **Accepted:** 09.08.2023 **Published online:** 30.08.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.034

Преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) появилось в клинической практике с конца 1980-х гг. (ранее его называли преимплантационной генетической диагностикой (ПГД) и преимплантационным генетическим скринингом). Целью первых программ ПГД было исключение передачи по наследству заболеваний, сцепленных с X-хромосомой. С последующим развитием технологий эмбриологического и лабораторного этапов спектр определения возможных генетических заболеваний значительно расширился, а задачами метода стали не только профилактика наследственных заболеваний, но и повышение шансов рождения здорового ребенка у сложных категорий пациентов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [1].

С развитием возможностей эмбриологических и генетических лабораторий, наибольшую эффективность и распространение в настоящее время приобрело преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ПГТ-А) методом высокопроизводительного секвенирования нового поколения (*next generation sequencing*, NGS) с биопсией трофэктодермы (ТФЭ). Многочисленные исследования показывают высокие значения чувствительности и специфичности данного подхода, однако одним из его недостатков остается необходимость инвазивного вмешательства [1, 2].

Другая проблема, привлекающая внимание исследователей, — мозаицизм эмбрионов, а также соответствие хромосомного состава ТФЭ эмбриона его внутренней клеточной массе (ВКМ) [3, 4]. И хотя биопсия нескольких клеток позволяет частично преодолеть указанную проблему, полностью избежать риска отвергнуть эмбрион, перенос которого в полость матки способен привести к рождению здорового ребенка, не представляется возможным.

Новой перспективной технологией ПГТ-А является неинвазивный анализ внеклеточной ДНК отработанной культуральной среды (ОКС), в которой развивался эмбрион. Получение адекватных результатов требует определенных условий культивирования эмбриона и сбора образцов среды (для увеличения концентрации ДНК и снижения возможной контаминации), но не требует инвазивного вмешательства [5–7]. Ряд ученых полагают, что неинвазивное преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ниПГТ-А) — это более информативный метод ПГТ-А, особенно в связи с тем, что, по данным литературы, внеклеточная ДНК ОКС происходит не только из клеток ТФЭ, но и ВКМ [8, 9]. Другие авторы, напротив, утверждают о его нерепрезентативности, так как до сих пор остается не до конца решенным вопрос об истинном происхождении внеклеточной ДНК в ОКС [10, 11]. Тем не менее, данный подход интенсивно изучается исследователями, и, вероятно, может быть использован в клинической практике.

Целью работы было оценить эффективность ниПГТ-А. Для этого был проведен повторный анализ бластоцист, анеуплоидных по результатам ПГТ-А с биопсией ТФЭ, методом ниПГТ-А.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эмбриологический этап проводили на базе отделения ВРТ в лечении бесплодия имени Б. В. Леонова, ПГТ-А и ниПГТ-А выполняли в Институте репродуктивной генетики.

В исследовании было включено 11 эмбрионов от семи супружеских пар. Все бластоцисты были анеуплоидными

по результатам предшествующего ПГТ-А с биопсией ТФЭ. Эмбрионы были получены после проведения циклов ВРТ с ПГТ-А методом NGS в период с апреля по сентябрь 2020 г.

Культивирование эмбрионов, биопсия ТФЭ и ПГТ-А

Оплодотворение ооцитов проводили методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в цитоплазму ооцита (ИКСИ), после чего оплодотворенные клетки переносили в культуральную среду Continuous Single Culture Complete (CSCM) (IrvineScientific; США). Все этапы культивирования, а также морфологическую оценку бластоцист выполняли по ранее описанной методике [12]. На 5–6 сутки после оплодотворения была выполнена биопсия клеток ТФЭ у эмбрионов, соответствующих отличному и хорошему качеству согласно морфологическим критериям. Для биопсии использовали боросиликатные иглы. После биопсии эмбрионы криоконсервировали путем витрификации согласно инструкции производителя культуральных сред. Полученные клетки передавали в лабораторию в пробирках типа Эппендорф, содержащих лизирующий буфер, и хранили при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до дальнейшего анализа. ПГТ-А выполняли методом высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS) на платформе Illumina (Illumina; США) согласно протоколу производителя. Полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения SeqVario («ДНК-Технология»; Россия).

Размораживание эмбрионов, культивирование и сбор отработанной культуральной среды

Размораживание донированных эмбрионов проводили на средах Kitazato (Kitazato; Япония) согласно протоколу производителя. Далее бластоцисты культивировали в индивидуальных каплях среды CSCM по 10 мкл в течение 9 ч. Отрицательным контролем служила капля культуральной среды (1 образец), находящаяся в тех же условиях культивирования, но не содержащая эмбрион. Весь объем отработанной культуральной среды собирали в пробирки типа Эппендорф и передавали в лабораторию, где их хранили при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 14 дней до дальнейшего анализа.

Неинвазивное преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии

НиПГТ-А проводили с помощью наборов NICSInst (Yicon Genomics; Китай) согласно инструкции производителя. Высокопроизводительное секвенирование осуществляли на приборе NextSeq (Illumina; США). Анализ полученных результатов проводили с помощью оригинальных алгоритмов и программного обеспечения, разработанных в Центре для осуществления проведения ПГТ-А методом NGS SeqVario.

Анализ полученных данных

Статистический анализ проводили в программе Jamovi (бесплатный свободно распространяемый пакет статистической обработки). Полученные результаты сравнивали на соответствие с предшествующими данными по ПГТ-А. Первичной конечной точкой данного исследования считали частоту полного соответствия кариотипа эмбрионов по данным ПГТ-А и ниПГТ-А. Вторичной

конечной точкой оценивали частоту клинического соответствия эмбрионов (эуплоидный/анеуплоидный) по данным ПГТ-А и ниПГТ-А. Для описания категориальных бинарных данных использовали абсолютные числа N и процентные доли от общего числа в группе P в формате $N (P\%)$. С целью определения статистической значимости полного и клинического соответствия результатов использовали биномиальный тест. Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Суммарно выполнили анализ 12 образцов ОКС: 11 образцов, в которых были культивированы эмбрионы, и один контрольный образец. Все образцы группы исследования успешно прошли полногеномную амплификацию и анализ методом NGS. В контрольном образце ДНК не была детектирована. Результаты ПГТ-А и ниПГТ-А, а также их соответствие для исследуемых эмбрионов представлены в табл. 1.

Обращает на себя внимание, что в одном случае (9,1%) из 11 были получены хаотичные результаты по данным ниПГТ-А, не позволяющие провести диагностику состояния кариотипа (рис. 1).

В одном случае из 10 (10%) вследствие высокого уровня шума сигнала по данным ниПГТ-А анеуплоидию в эмбрионе выявить не удалось, вследствие чего полученный результат рассматривали как эуплоидный (рис. 2).

Полное соответствие результатов получено в семи из 10 случаев (70%) (рис. 3). Соответствие результатов по половым хромосомам получено в девяти из 10 случаев (90%). Клиническое соответствие результатов — в девяти из 10 случаев (90%).

Сравнение полного и клинического соответствия результатов ПГТ-А и ниПГТ-А представлено в табл. 2. Статистически значимой разницы по данным биномиального теста не было найдено для частоты полного соответствия результатов ПГТ-А и ниПГТ-А ($p = 0,344$), но был найден статистически значимый результат для клинического соответствия ПГТ-А и ниПГТ-А ($p = 0,021$).

Таблица 1. Результаты ПГТ-А и ниПГТ-А исследуемых эмбрионов

№	Результат ПГТ-А	Результат ниПГТ-А	Полное соответствие (+/-)	Клиническое соответствие (+/-)	Соответствие пола
1	(11)х3 Пол – XX	(11)х3 Пол – XX	+	+	+
2	(20)х3, (21)х1 Пол – XX	(20)х3, (21)х1 Пол – XX	+	+	+
3	(17)х1, (22)х1 Пол – XY	(17)х1, (22)х1 Пол – XY	+	+	+
4	(8)х3, (21)х1	«гетероплоидный»			
5	(22)х3 Пол – XY	(22)х3 Пол – XY	+	+	+
6	(8)х1, (18)х3, (22)х1 Пол – XX	(8)х1, (18)х3, (22)х1 Пол – XX	+	+	+
7	(15)х3, (17)х3 Пол – XY	(15)х3, (17)х3 Пол – XY	+	+	+
8	(21)х3 Пол – XY	(15)х1, (21)х3 Пол – XY	-	+	+
9	(22)х3 Пол – XY	Del 5(p) Пол – XX	-	+	-
10	(21)х2,5 Пол – XY	N, XY	-	-	+
11	(16)х3 Пол – XY	(16)х3 Пол – XY	+	+	+

При оценке результатов по намерению исследовать, т. е. при оценке всех 11 эмбрионов, включенных в исследование, с практической точки зрения, данные результаты означают, что в 81,8% случаев клиническое решение о возможности переноса эмбриона в полость матки не было бы изменено. В 9,1% случаев клиническое решение о возможности переноса эмбриона по данным только ниПГТ-А было бы другим (эуплоидный эмбрион был рекомендован для переноса). В 9,1% случаев клиническое заключение о возможности переноса эмбриона было вынести невозможно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данное исследование было запланировано как пилотный проект и было ограничено небольшой выборкой, наличием только анеуплоидных эмбрионов по данным ПГТ-А, отсутствием анализа хромосомного состава ВКМ исследуемых бластоцист. Тем не менее, результаты работы продемонстрировали 100%-ю частоту детекции внеклеточной ДНК (внДНК) в ОКС, а также высокую долю получения результатов, пригодных для клинической интерпретации (90,9%).

В большинстве исследований, проведенных к настоящему времени, тоже принимали за референс показатели ПГТ-А с биопсией ТФЭ и сравнивали их с результатами ниПГТ-А. Частота соответствия результатов в подобных работах составляла 33,3–89,1% [5, 8, 13–17]. Однако следует отметить, что в упомянутых публикациях чаще описывали протокол ниПГТ-А в нативном цикле. В нашем исследовании был использован протокол работы с размороженными эмбрионами, и частота соответствия результатов согласовалась с данными приведенных исследований (полное соответствие — в 70% случаев, клиническое соответствие — в 90% случаев).

В других работах за референс принимали целый эмбрион, а ОКС собирали после культивирования размороженных эмбрионов. Частота полного соответствия результатов ниПГТ-А и ПГТ-А для всего эмбриона в подобных исследованиях варьировала от 32,2 до 89,9%. Xu et al. оценивали ОКС размороженных

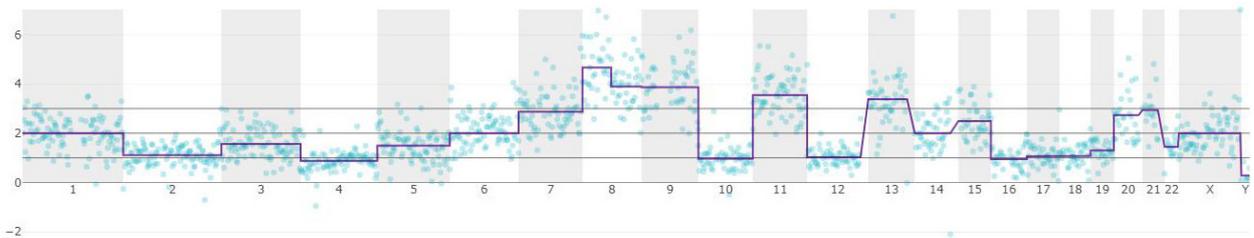


Рис. 1. Пример результата «гетероплоидный» по данным ниПГТ-А

эмбрионов 3 суток развития после их культивирования до 5 суток. Из 42 эмбрионов анализ 66,7% показал полное соответствие результатов [18]. Yin et al. анализировали ОКС 75 размороженных бластоцист 5–6 суток развития после их культивирования в течение 24 ч. Клиническая частота соответствия результатов составила 89,8%, полная частота соответствия — 32,2% [19]. Huang et al. удалось получить информацию по ОКС 48 эмбрионов из 52 на стадии 5–6 суток развития после их размораживания и культивирования тоже в течение 24 ч. Частота полного соответствия результатов составила 85,4% [9]. Shitara et al. показали полную частоту соответствия результатов в 56,3% случаев при анализе ОКС после размораживания и культивирования эмбрионов 5 суток развития в течение 24 ч, 6 суток — в течение 3 ч [20]. Xu et al. анализировали 35 размороженных эмбрионов 3-х или 5-х суток развития. Минимальное время культивирования составило 24 ч. Успешную полногеномную амплификацию прошли 88,6% образцов ОКС. Полная частота соответствия результатов ниПГТ-А и ПГТ-А по ВКМ составила 58,3% (14/24) [21].

Следует отметить, что объем капли культуральной среды в указанных исследованиях с культивированием размороженных эмбрионов варьировал от 10 до 30 мкл, а объем анализируемых образцов — от 3,5 мкл до 25 мкл.

Время культивирования в большинстве случаев составляло не менее 24 ч. В нашем исследовании показана успешная детекция и анализ внДНК в ОКС при культивировании размороженных бластоцист в течение 9 ч в капле объемом 10 мкл, что продемонстрировало возможность получения адекватных результатов после культивирования размороженных эмбрионов в более короткий период времени.

Особый интерес представляет изучение дополнительных возможностей применения ниПГТ-А в клинической практике. Заслуживает внимания работа, авторы которой проводили ниПГТ-А для мозаичных эмбрионов по результатам предшествующего ПГТ-А с биопсией ТФЭ. Они разморозили и рекультивировали в течение 14–18 ч 41 мозаичный эмбрион, а далее повторно провели ПГТ-А с биопсией ТФЭ и всего эмбриона, а также ниПГТ-А по ОКС. Результаты анализа ВКМ показали нормальный хромосомный набор для 84,4% (35/41) эмбрионов. Данные ниПГТ-А соответствовали результатам ПГТ-А по биопсии всего эмбриона в 74,4% случаев [22]. В рамках опубликованной работы авторы доложили ретроспективные данные о переносе мозаичных эмбрионов для 60 пар, не имевших зуплоидные эмбрионы. У 30 пациенток впоследствии

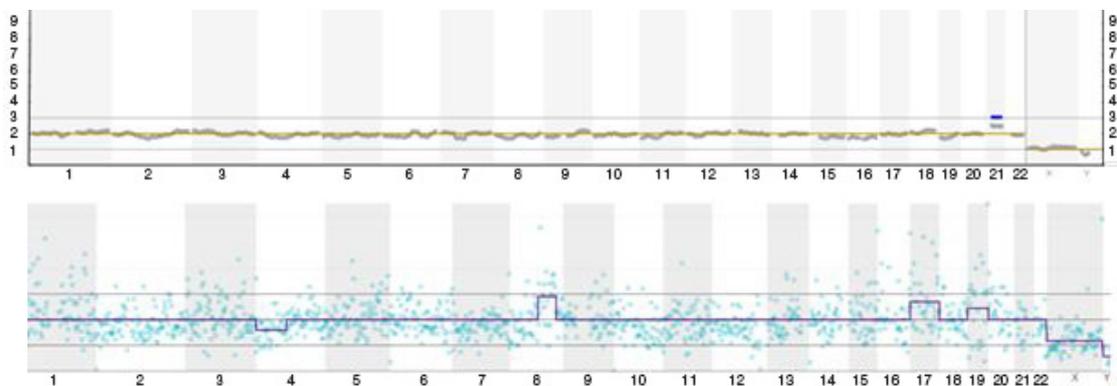


Рис. 2. Результаты ПГТ-А и ниПГТ-А эмбриона с разнотением ПГТ-А и ниПГТ-А: верхний график — результат «анеуплоидный» по данным ПГТ-А, нижний график — «эуплоидный» по данным ниПГТ-А

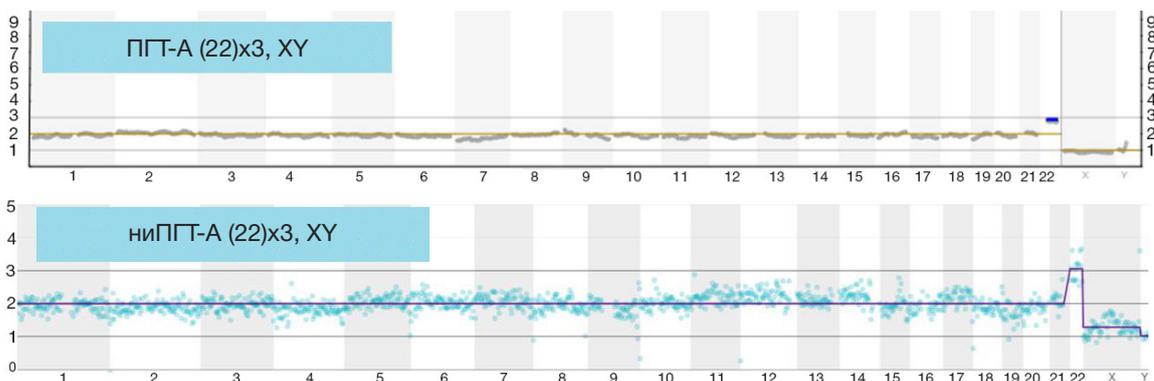


Рис. 3. Пример полного соответствия результатов по данным ПГТ-А и ниПГТ-А

Таблица 2. Сравнение частоты полного и клинического соответствия результатов ПГТ-А и ниПГТ-А по данным биномиального теста

Соответствие	Да / Нет	Доля	Всего	Пропорция	p
Полное	Да	7	10	0,7	$p = 0,344$
	Нет	3		0,3	
Клиническое	Да	9	10	0,9	$p = 0,021$
	Нет	1		0,1	

была диагностирована клиническая беременность. Таким образом, исследователи сделали предположение о возможном преимуществе дополнительного применения ниПГТ-А в подобных клинических случаях.

В нашем исследовании также в одном случае был получен эуплоидный результат ниПГТ-А для анеуплоидного эмбриона (кариотип (21)–1,5) по данным предшествующего ПГТ-А с биопсией ТФЭ. Причем отсутствие нарушений именно по 21 паре хромосом было четко фиксировано (рис. 2). Учитывая вышесказанное, целесообразно собирать ОКС в циклах с ПГТ-А с целью изучения возможности дополнительного проведения ниПГТ-А в сложных или сомнительных случаях для более корректной установки диагноза в случае необходимости.

Также интересна работа 2022 г., в которой оценивали возможность клинического применения ниПГТ-А в циклах ВРТ с переносом размороженного эмбриона (РЭ) [23]. Во всех случаях эмбрионы размораживали и культивировали в течение 6 ч в капле объемом 20 мкл перед переносом в полость матки. Авторы ретроспективно проанализировали исходы переносов РЭ для 210 пациенток, в зависимости от результатов ниПГТ-А. Частота клинической беременности, продолжающейся беременности и живорождения была значительно выше для эмбрионов, эуплоидных по ниПГТ-А, в сравнении с анеуплоидными (56,2% против 29,4%). Однако не были обнаружены значимые различия для указанных репродуктивных исходов для «эуплоидных» и «хаотичных» эмбрионов по данным ниПГТ-А (56,2% против 60,4%). Доля анеуплоидных эмбрионов была значительно выше среди эмбрионов низкого и среднего качества по морфологии, в сравнении с эмбрионами хорошего качества (46%, 34,6% и 21,5% соответственно; $p = 0,013$). Исследователи отметили возможное преимущество применения комбинированного подхода (морфологическая оценка в сочетании с ниПГТ-А) к выбору наиболее перспективного эмбриона для переноса в полость матки. Причем авторы предложили ранжировать эмбрионы в порядке снижения приоритета

для ПЭ следующим образом: 1) эуплоидные эмбрионы хорошего качества; 2) «хаотичные» эмбрионы хорошего качества; 3) эуплоидные эмбрионы среднего качества по морфологии; 4) «хаотичные эмбрионы» среднего качества по морфологии.

Следует подчеркнуть, что и другие исследователи советуют с осторожностью трактовать хаотичные результаты ниПГТ-А, с большей вероятностью отражающие условия хранения биологического материала и процессы деградации ДНК, чем хромосомный состав эмбрионов [8, 24]. Мы в своей работе тоже в одном случае (9,1%) получили хаотичные результаты ниПГТ-А (рис. 1).

Таким образом, следует отметить, что работа с вДНК и ниПГТ-А имеет ряд особенностей, которые следует учитывать при интерпретации результатов и выборе наиболее перспективных эмбрионов для переноса в полость матки. Однако как главную его черту необходимо выделить неинвазивность метода. Учитывая, что в ряде научных работ появляются данные, свидетельствующие о возможном негативном влиянии биопсии ТФЭ на течение беременности (гипертензивные расстройства, преждевременные роды, нарушения плацентации) и здоровье новорожденного, изучение именно ниПГТ-А представляется особенно актуальным [25–27]. Тем не менее, следует отметить, что в значительном количестве других работ данной взаимосвязи не обнаружено [28–30].

Выводы

Неинвазивное преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии — перспективный, не требующий биопсии, метод диагностики хромосомного статуса эмбрионов. Необходимо проведение дополнительных исследований для дальнейшей разработки и усовершенствования методики, определения возможности и показаний ее использования в клинической практике.

Литература

- Sciorio R, Tramontano L, Catt J. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) and genetic testing for aneuploidy (PGT-A): status and future challenges. *Gynecol. Endocrinol.* 2020; 36 (1): 6–11.
- Малышева О. В., Пендина А. А., Ефимова О. А., Чиряева О. Г. Предимплантационное генетическое тестирование. В книге: Коган И. Ю., редактор. Экстракорпоральное оплодотворение: практическое руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021; с. 357–67.
- Жигалина Д. И., Скрыбин Н. А., Канбекова О. Р., Артюхова В. Г., Светлаков А. В., Лебедев И. Н. Сравнительная цитогенетика эмбриобласта, трофэктодермы и внутриполостной жидкости blastocисты человека. *Медицинская генетика.* 2018; 17 (2): 46–52.
- Макарова Н. П., Екимов А. Н., Кулакова Е. В., Драпкина Ю. С., Сысоева А. П., Краснова Н. А. и др. Особенности мозаицизма у эмбрионов человека в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология.* 2021; (7): 144–51.
- Navarro-Sánchez L, García-Pascual C, Rubio C, Simón C. Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies: an update. *Reprod. Biomed. Online.* 2022; 44 (5): 817–28.
- Brouillet S, Martinez G, Coutton C, Hamamah S. Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review. *Reprod. Biomed. Online.* 2020; 40 (6): 779–6.
- Лисицына О. И., Макарова Н. П., Долгушина Н. В. Оценка внеклеточной ДНК как метод неинвазивного преимплантационного генетического тестирования эмбрионов в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология.* 2022; 6: 13–19.
- Rubio C, Navarro-Sánchez L, García-Pascual CM, Ocali O, Cimadomo D, Venier W, et al. Multicenter prospective study of concordance between embryonic cell-free DNA and trophectoderm biopsies from 1301 human blastocysts. *Am J*

- Obstet Gynecol. 2020; 223 (5): 751.e1–13.
9. Huang L, Bogale B, Tang Y, Lu S, Xie XS, Racowsky C. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophectoderm biopsy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019; 116 (28): 14105–12.
 10. Rubio C, Racowsky C, Barad DH, Scott RT, Simon C. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent culture medium as a substitute for trophectoderm biopsy. *Fertil Steril*. 2021; 115 (4): 841–9.
 11. Tomic M, Vrtacnik Bokal E, Stimpfel M. Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidy and the mystery of genetic material: a review article. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (7): 3568.
 12. Макарова Н. П., Лисицына О. И., Непша О. С., Красный А. М., Садекова А. А., Незлина Е. А. и др. Особенности профиля экспрессии митохондриальной ДНК в среде культивирования эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология*. 2022; (3): 89–96.
 13. Chen L, Sun Q, Xu J, Fu H, Liu Y, Yao Y, et al. A Non-invasive Chromosome Screening Strategy for Prioritizing in vitro Fertilization Embryos for Implantation. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9: 708322.
 14. Ho JR, Arrach N, Rhodes-Long K, Ahmady A, Ingles S, Chung K, et al. Pushing the limits of detection: investigation of cell-free DNA for aneuploidy screening in embryos. *Fertil Steril*. 2018; 110 (3): 467–475.e2.
 15. Rubio C, Rienzi L, Navarro-Sánchez L, Cimadomo D, García-Pascual CM, Albricci L, et al. Embryonic cell-free DNA versus trophectoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications. *Fertil Steril*. 2019; 112 (3): 510–19.
 16. Vera-Rodriguez M, Diez-Juan A, Jimenez-Almazan J, Martinez S, Navarro R, Peinado V, et al. Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Hum Reprod*. 2018; 33 (4): 745–56.
 17. Yeung QSY, Zhang YX, Chung JPW, Lui WT, Kwok YKY, Gui B, et al. A prospective study of non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies (NiPGT-A) using next-generation sequencing (NGS) on spent culture media (SCM). *J Assist Reprod Genet*. 2019; 36 (8): 1609–21.
 18. Xu J, Fang R, Chen L, Chen D, Xiao JP, Yang W, 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): 11907–12.
 19. Yin B, Zhang H, Xie J, Wei Y, Zhang C, Meng L. Validation of preimplantation genetic tests for aneuploidy (PGT-A) with DNA from spent culture media (SCM): concordance assessment and implication. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021; 19 (1): 41.
 20. Shitara A, Takahashi K, Goto M, Takahashi H, Iwasawa T, Onodera Y, et al. Cell-free DNA in spent culture medium effectively reflects the chromosomal status of embryos following culturing beyond implantation compared to trophectoderm biopsy. *PLoS One*. 2021; 16 (2): e0246438.
 21. Xu CL, Wei YQ, Tan QY, Huang Y, Wu JJ, Li CY, et al. Concordance of PGT for aneuploidies between blastocyst biopsies and spent blastocyst culture medium. *Reprod Biomed*. 2023; 46 (3): 483–90.
 22. Li X, Hao Y, Chen D, Ji D, Zhu W, Zhu X, et al. Non-invasive preimplantation genetic testing for putative mosaic blastocysts: a pilot study. *Hum Reprod*. 2021; 36 (7): 2020–34.
 23. Chen R, Tang N, Du H, Yao Y, Zou Y, Wang J, et al. Clinical application of noninvasive chromosomal screening for elective single-blastocyst transfer in frozen-thawed cycles. *J Transl Med*. 2022; 20 (1): 553.
 24. Rubio C, Simón C. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy: Is the glass half-empty or half-full? *Fertil Steril*. 2021; 115 (6): 1426–7.
 25. Kakourou G, Mamas T, Vrettou C, Traeger-Synodinos J. An Update on Non-invasive Approaches for Genetic Testing of the Preimplantation Embryo. *Curr Genomics*. 2022; 23 (5): 337–52.
 26. Alteri A, Cermisoni GC, Pozzoni M, Gaeta G, Cavoretto PI, Viganò P. Obstetric, neonatal, and child health outcomes following embryo biopsy for preimplantation genetic testing. *Hum Reprod Updat*. 2023; 29 (3): 291–306.
 27. Makhijani R, Bartels CB, Godiwala P, Bartolucci A, DiLuigi A, Nulsen J, et al. Impact of trophectoderm biopsy on obstetric and perinatal outcomes following frozen-thawed embryo transfer cycles. *Hum Reprod*. 2021; 36 (2): 340–8.
 28. Awadalla MS, Park KE, Latack KR, McGinnis LK, Ahmady A, Paulson RJ. Influence of Trophectoderm Biopsy Prior to Frozen Blastocyst Transfer on Obstetrical Outcomes. *Reprod Sci*. 2021; 28 (12): 3459–65.
 29. He H, Jing S, Lu CF, Tan YQ, Luo KL, Zhang SP, et al. Neonatal outcomes of live births after blastocyst biopsy in preimplantation genetic testing cycles: a follow-up of 1,721 children. *Fertil Steril*. 2019; 112 (2): 82–88.
 30. Swanson K, Huang D, Kaing A, Blat C, Rosenstein MG, Mok-Lin E, et al. Is Preimplantation Genetic Testing Associated with Increased Risk of Abnormal Placentation After Frozen Embryo Transfer? *Am J Perinatol*. 2021; 38 (2): 105–10.

References

1. Sciorio R, Tramontano L, Catt J. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) and genetic testing for aneuploidy (PGT-A): status and future challenges. *Gynecol. Endocrinol*. 2020; 36 (1): 6–11.
2. Malysheva OV, Pendina AA, Efimova OA, Chiryayeva OG. Predymplantacionnoe geneticheskoe testirovanie. V knige: Kogan I. Yu., redaktor. *Ehkstrakorporal'noe oplodotvorenje: prakticheskoe rukovodstvo dlya vrachej*. M.: GEHOTAR-Media, 2021; s. 357–67. Russian.
3. Zhigalina DI, Skryabin NA, Kanbekova OR, Artyukhova VG, Svetlakov AV, Lebedev IN. Comparative cytogenetics of embryoblast, trophectoderm and blastocoele fluid of human blastocyst. *Medical Genetics*. 2018; 17 (2): 46–52. Russian.
4. Makarova NP, Ekimov AN, Kulakova EV, Drapkina YuS, Sysoeva AP, Krasnova NA, et al. Characteristics of embryonic mosaicism in infertility treatment with assisted reproductive technologies. *Obstetrics and gynecology*. 2021; (7): 144–51. Russian.
5. Navarro-Sánchez L, García-Pascual C, Rubio C, Simón C. Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies: an update. *Reprod. Biomed. Online*. 2022; 44 (5): 817–28.
6. Brouillet S, Martinez G, Coutton C, Hamamah S. Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review. *Reprod. Biomed. Online*. 2020; 40 (6): 779–6.
7. Lisitsyna OI, Makarova NP, Dolgushina NV. Evaluation of extracellular DNA as a method for non-invasive preimplantation genetic testing of embryos in infertility treatment programs using assisted reproductive technologies. *Obstetrics and gynecology*. 2022; (6): 13–19. Russian.
8. Rubio C, Navarro-Sánchez L, García-Pascual CM, Ocali O, Cimadomo D, Venier W, et al. Multicenter prospective study of concordance between embryonic cell-free DNA and trophectoderm biopsies from 1301 human blastocysts. *Am J Obstet Gynecol*. 2020; 223 (5): 751.e1–13.
9. Huang L, Bogale B, Tang Y, Lu S, Xie XS, Racowsky C. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophectoderm biopsy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019; 116 (28): 14105–12.
10. Rubio C, Racowsky C, Barad DH, Scott RT, Simon C. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent culture medium as a substitute for trophectoderm biopsy. *Fertil Steril*. 2021; 115 (4): 841–9.
11. Tomic M, Vrtacnik Bokal E, Stimpfel M. Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidy and the mystery of genetic material: a review article. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (7): 3568.
12. Makarova NP, Lisitsyna OI, Nepsha OS, Krasnyi AM, Sadekova AA, Nezlina AL, et al. Mitochondrial DNA expression profile in embryo culture medium in assisted reproductive technology. *Obstetrics and gynecology*. 2022; (3): 89–96. Russian.
13. Chen L, Sun Q, Xu J, Fu H, Liu Y, Yao Y, et al. A Non-invasive Chromosome Screening Strategy for Prioritizing in vitro Fertilization Embryos for Implantation. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9: 708322.

14. Ho JR, Arrach N, Rhodes-Long K, Ahmady A, Ingles S, Chung K, et al. Pushing the limits of detection: investigation of cell-free DNA for aneuploidy screening in embryos. *Fertil Steril*. 2018; 110 (3): 467–475.e2.
15. Rubio C, Rienzi L, Navarro-Sánchez L, Cimadomo D, García-Pascual CM, Albricci L, et al. Embryonic cell-free DNA versus trophoctoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications. *Fertil Steril*. 2019; 112 (3): 510–19.
16. Vera-Rodríguez M, Díez-Juan A, Jiménez-Almazan J, Martínez S, Navarro R., Peinado V, et al. Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Hum Reprod*. 2018; 33 (4): 745–56.
17. Yeung QSY, Zhang YX, Chung JPW, Lui WT, Kwok YKY, Gui B, et al. A prospective study of non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies (NiPGT-A) using next-generation sequencing (NGS) on spent culture media (SCM). *J Assist Reprod Genet*. 2019; 36 (8): 1609–21.
18. Xu J, Fang R, Chen L, Chen D, Xiao JP, Yang W, 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): 11907–12.
19. Yin B, Zhang H, Xie J, Wei Y, Zhang C, Meng L. Validation of preimplantation genetic tests for aneuploidy (PGT-A) with DNA from spent culture media (SCM): concordance assessment and implication. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021; 19 (1): 41.
20. Shitara A, Takahashi K, Goto M, Takahashi H, Iwasawa T, Onodera Y, et al. Cell-free DNA in spent culture medium effectively reflects the chromosomal status of embryos following culturing beyond implantation compared to trophoctoderm biopsy. *PLoS One*. 2021; 16 (2): e0246438.
21. Xu CL, Wei YQ, Tan QY, Huang Y, Wu JJ, Li CY, et al. Concordance of PGT for aneuploidies between blastocyst biopsies and spent blastocyst culture medium. *Reprod Biomed*. 2023; 46 (3): 483–90.
22. Li X, Hao Y, Chen D, Ji D, Zhu W, Zhu X, et al. Non-invasive preimplantation genetic testing for putative mosaic blastocysts: a pilot study. *Hum Reprod*. 2021; 36 (7): 2020–34.
23. Chen R, Tang N, Du H, Yao Y, Zou Y, Wang J, et al. Clinical application of noninvasive chromosomal screening for elective single-blastocyst transfer in frozen-thawed cycles. *J Transl Med*. 2022; 20 (1): 553.
24. Rubio C, Simón C. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy: Is the glass half-empty or half-full? *Fertil. Steril*. 2021; 115 (6): 1426–7.
25. Kakourou G, Mamas T, Vrettou C, Traeger-Synodinos J. An Update on Non-invasive Approaches for Genetic Testing of the Preimplantation Embryo. *Curr Genomics*. 2022; 23 (5): 337–52.
26. Alteri A, Cermisoni GC, Pozzoni M, Gaeta G, Cavoretto PI, Viganò P. Obstetric, neonatal, and child health outcomes following embryo biopsy for preimplantation genetic testing. *Hum Reprod Updat*. 2023; 29 (3): 291–306.
27. Makhijani R, Bartels CB, Godiwala P, Bartolucci A, DiLuigi A, Nulsen J, et al. Impact of trophoctoderm biopsy on obstetric and perinatal outcomes following frozen-thawed embryo transfer cycles. *Hum Reprod*. 2021; 36 (2): 340–8.
28. Awadalla MS, Park KE, Latack KR, McGinnis LK, Ahmady A, Paulson RJ. Influence of Trophoctoderm Biopsy Prior to Frozen Blastocyst Transfer on Obstetrical Outcomes. *Reprod Sci*. 2021; 28 (12): 3459–65.
29. He H, Jing S, Lu CF, Tan YQ, Luo KL, Zhang SP, et al. Neonatal outcomes of live births after blastocyst biopsy in preimplantation genetic testing cycles: a follow-up of 1,721 children. *Fertil Steril*. 2019; 112 (2): 82–88.
30. Swanson K, Huang D, Kaing A, Blat C, Rosenstein MG, Mok-Lin E, et al. Is Preimplantation Genetic Testing Associated with Increased Risk of Abnormal Placentation After Frozen Embryo Transfer? *Am J Perinatol*. 2021; 38 (2): 105–10.