

Міністерство освіти і науки України
Департамент науки і освіти Харківської обласної державної адміністрації
Комунальний заклад «Харківська обласна Мала академія наук
Харківської обласної ради»

Відділення: хімія та біологія

Секція: медицини

**ВИЗНАЧЕННЯ ЧАСТОТИ ХРОМОСОМНИХ ПОРУШЕНЬ ЕМБРІОНІВ
У ЖІНОК РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП ЗА ДОПОМОГОЮ
ПРЕДІМПЛАНТАЦІЙНОЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ**

Роботу виконала:

Денисенко Дар'я Євгенівна,
учениця 10 класу Комунального закладу
«Харківський ліцей № 116» Харківської
міської ради Харківської області, вихованка
Комунального закладу «Харківська обласна
Мала академія наук Харківської обласної
ради»

Науковий керівник:

Бугакова Оксана Володимирівна,
учитель біології Комунального закладу
«Харківський ліцей № 116» Харківської
міської ради Харківської області, кандидат
педагогічних наук, заслужений працівник
освіти України

Харків – 2024

ВИЗНАЧЕННЯ ЧАСТОТИ ХРОМОСОМНИХ ПОРУШЕНЬ ЕМБРІОНІВ У ЖІНОК РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП ЗА ДОПОМОГОЮ ПРЕДІМПЛАНТАЦІЙНОЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ

Денисенко Дар'я Євгенівна; Комунальний заклад «Харківська обласна Мала академія наук Харківської обласної ради»; Комунальний заклад «Харківський ліцей № 116 Харківської міської ради»; 10 клас; м. Харків;

Бугакова Оксана Володимирівна, учитель біології Комунального закладу «Харківський ліцей № 116 Харківської міської ради», кандидат педагогічних наук, заслужений працівник освіти України.

Виявлення та діагностування структурних змін у хромосомах ембріону, а також їхнього кількісного складу є важливою проблемою в сучасному світі. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, хромосомні порушення зустрічаються в 0,3% всіх новонароджених, у 25% всіх самовільних абортів і в 50-60% самовільних абортів першого триместру вагітності. Завдяки сучасним методам генетики отримали можливість здійснювати пренатальну діагностику, що забезпечує виявлення в плода широкого спектру спадкових захворювань та хромосомних аберацій. Генетичні методики інтегруються з допоміжними репродуктивними технологіями, значно підвищують діагностичну спроможність виявлення генетично обумовлених аномалій ембріона. Це й зумовлює дослідження частоти хромосомних порушень ембріонів у жінок різних вікових груп за допомогою предімплантаційної генетичної діагностики.

У проведеному дослідженні показано, що предімплантаційне генетичне тестування анеуплоїдій є сучасним та ефективним методом виявлення хромосомних аномалій на ранніх етапах розвитку (виявлення кількісних порушень хромосом - анеуплоїдій), метою якого є відбір здорового ембріона для проведення ембріотрансферу.

Встановлено, що частота отримання нормальних ембріонів відрізняється в жінок різних вікових груп та суттєво зменшується в жінок старшого репродуктивного віку.

Визначено, що з віком суттєво зростає кількість ембріонів з різними генетичними порушеннями (моносомії, трисомії та множинні хромосомні вади): найменший показник моносомій спостерігався в I групі (вік до 25) 5,26%, а найвищий – у V групі (вік від 41) й становив 25,7%. Найнижчі показники трисомій та множинних хромосомних вад були в II (вік 25-30) та III (вік 31-35) групах та складали відповідно в разі трисомій 4,2% та 4,8%, а у випадках множинних хромосомних вад – 18,9% та 17,1%. Найвищий показник трисомій та множинних хромосомних вад був у V групі (вік від 41) та складав відповідно 13% та 37,6%. Слід зазначити, що в I групі (вік до 25) випадків отримання ембріонів з трисоміями або множинними хромосомними вадами не відмічалось.

Ключові слова: хромосомні аномалії, предімплантаційна генетична діагностика.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. УЯВЛЕННЯ ПРО СТРАТЕГІЇ РЕПРОДУКЦІЇ.....	7
1.1. Будова та склад хромосомного апарату людини.....	9
1.1.1. Організація генома людини.....	9
1.1.2. Фази клітинного циклу.....	13
1.2. Сучасні методи генетичного дослідження.....	17
1.3. Причини та наслідки генетичних захворювань людини.....	21
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	27
РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ЧАСТОТИ ХРОМОСОМНИХ ПОРУШЕНЬ ЕМБРІОНІВ У ЖІНОК РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП ЗА ДОПОМОГОЮ ПРЕДІМПЛАНТАЦІЙНОЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ.....	29
3.1. Частота нормальних ембріонів та ембріонів з різними генетичними порушеннями в жінок різних вікових груп.....	29
3.2. Дослідження частоти хромосомних аномалій	31
ВИСНОВКИ.....	33
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	34
ДОДАТКИ.....	37

ВСТУП

Виявлення та дослідження структурних змін у хромосомах ембріону, а також їхнього кількісного складу є важливою проблемою в сучасному світі. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, хромосомні порушення зустрічаються в 0,3% всіх новонароджених, у 25% всіх самовільних абортів і в 50-60% самовільних абортів першого триместру вагітності [2].

З розвитком генетики людини, у тому числі й медичної генетики, встановлена спадкова природа багатьох захворювань і синдромів, що раніше вважалися хворобами з невстановленою причиною [1].

Спадкові захворювання – це спадкові розлади організму, пов'язані з порушенням генетичного апарату (генів, цілісності хромосом чи кількості хромосом). В основі спадкових хвороб лежать мутації: генні, хромосомні та геномні.

Хвороби зі спадковою схильністю – це захворювання, для розвитку яких необхідна взаємодія внутрішніх спадкових та зовнішніх несприятливих впливів середовища. До цієї групи належать: цукровий діабет, гіпертонічна хвороба, виразкова хвороба шлунку, бронхіальна астма, шизофренія, епілепсія та ін. [3].

Крім того, мають місце зміни в кількості хромосом в окремих парах (трисомії та моносомії). Так, у разі утворення триплоїдної зиготи зародок з високою вірогідністю гине на досить ранніх стадіях розвитку.

Новітні досягнення науки, такі як генна терапія з редагуванням гена, спрямовані на ефективне лікування генетичних хвороб, але ці технології знаходяться ще на стадії експериментальних розробок і потребують подальшого суттєвого й системного удосконалення [4].

Видатним досягненням медицини слід вважати визначення внеску генетичних чинників у формування безпліддя загалом та репродуктивних втрат зокрема. Завдяки сучасним методам дослідження генетики отримали можливість здійснювати пренатальну діагностику, що забезпечує виявлення у плода широкого спектру спадкових захворювань та хромосомних аберацій. В

останні роки, завдяки досягненням науки, з'явилася можливість визначати стать майбутньої людини ще на стадії доімплантаційного ембріона, що стало запорукою щодо створення стратегії елімінації спадкових хвороб, зчеплених зі статтю.

Генетичні методики інтегруються з допоміжними репродуктивними технологіями, значно підвищують діагностичну спроможність виявлення генетично обумовлених аномалій ембріона [5].

Метою роботи стало дослідити частоту хромосомних порушень ембріонів у жінок різних вікових груп за допомогою предімплантаційної генетичної діагностики.

Завдання дослідження:

1. Проаналізувати літературні джерела за темою дослідження.
2. Ознайомитися із сучасними методами генетичного дослідження.
3. З'ясувати наявність залежності отримання ембріонів з нормальним генотипом від віку жінок.
4. Оцінити частоту виникнення генетичних порушень ембріонів у жінок різних вікових груп.

Об'єкт дослідження: кількісний складу хромосом людини у клітинах трофктодерми.

Предмет дослідження: клітини трофктодерми (клітин ембріонального походження, що беруть участь у формуванні позазародкових тканин – плаценти).

Методи дослідження: молекулярно-генетичний метод, методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Під час дослідження проведено вивчення залежності впливу віку жінок на кількість ембріонів з хромосомними аномаліями. Виявлено, що зі збільшенням віку в жінок зростає частота анеуплоїдних ембріонів (ембріонів з порушенням нормальної кількості хромосом).

Практичне значення. Отримані дані можуть бути використані як обґрунтування доцільності застосування предімплантаційного генетичного тестування (ПГТ) в жінок різних вікових груп.

РОЗДІЛ 1

УЯВЛЕННЯ ПРО СТРАТЕГІЇ РЕПРОДУКЦІЇ

Здатність до розмноження є визначальною ознакою всіх живих організмів. Через розмноження ми передаємо свої гени новому поколінню. Кожне нове покоління по черзі розмножується або вимирає. Тих, хто вижив, «відбирають» за їхньою «придатністю» до життя та розмноження за допомогою стійкості до хвороб та успішної конкуренції за ресурси та партнерів. Таким чином, генофонд видів, що вижили, постійно адаптується до середовища, яке переважає, щоб забезпечити найкращу доступну «придатність». Таким чином, розмноження було центральним у нашій еволюції як виду *Homo sapiens* [6].

Більшість організмів розмножуються нестатевим (або вегетативним) шляхом. Наприклад, багато одноклітинних організмів розмножуються мітотично, як і окремі клітини нашого тіла. Мітотичні поділи породжують двох нащадків, генетично ідентичних один одному та одному з батьків. Серед багатоклітинних організмів деякі виділяють клітини або навіть частини тіла, з яких може бути створена інша генетично ідентична особа – процес, який називається регенерацією. Інші, включаючи деяких складних хребетних, таких як ящірки, відтворюють себе шляхом виділення спеціальної популяції яйцеклітин, які можуть диференціюватися в ембріони за відсутності запліднюючого сперматозоїда. Такий тип безстатевого розмноження називається партеногенезом і генерує абсолютно новий організм із тим же генним комплементом [7].

Партеногенез просто недоступний для ссавців. Таким чином, хоча можливо активувати яйцеклітину ссавців (включаючи яйцеклітину людини) за повної відсутності сперматозоїда, щоб вона пройшла ранні процеси розвитку й навіть могла імплантуватися в матці, ці партеногенетичні ембріони завжди зазнають невдачі та зрештою помруть [8].

Розмноження у ссавців незмінно статеве. Стать формально визначається в біології як процес, у якому генетично нова особа формується в результаті

змішування генів двох осіб. Отже, суттєвою особливістю статевого розмноження ссавців є те, що кожна нова особа отримує свої хромосоми двома рівними частинами: половина переноситься в чоловічій гаметі, сперматозоїді, і половина в жіночій гаметі, ооциті. Ці гамети об'єднуються під час запліднення, утворюючи генетично нову зиготу. Для подальшого розмноження особа, утворена з цієї зиготи, повинна передати тільки половину своїх власних хромосом новим зиготам наступного покоління. Таким чином, у видів, що розмножуються статевим шляхом, виділяється особлива популяція статевих клітин. Ці клітини піддаються процесу поділу мейозу, під час якого хромосомний вміст статевих клітин зменшується вдвічі, а генетичний склад кожної хромосоми змінюється в результаті обміну фрагментами гомологічних хромосом. Збільшене генетичне різноманіття, що створюється в популяції, яка розмножується статевим шляхом, пропонує багатше та різноманітніше джерело матеріалу, на якому може діяти природний відбір [6].

Запліднення ооцитів у більшості водних і земноводних хребетних досягається скиданням великої кількості ооцитів і сперматозоїдів у воду – нерест. Цей процес зовнішнього запліднення забезпечує можливість для легкого хижацтва яєць і ембріонів, що розвиваються з них, і тому утворюється велика кількість, що підвищує шанси деяких вижити [6].

Ссавці, навпаки, запліднюються внутрішньо. Ця репродуктивна стратегія зменшує кількість зрілих яйцеклітин у людей лише до одного або двох за раз, тим самим зменшуючи енергетичні ресурси, вкладені у розвиток яйцеклітин. Таким чином, у жінки формуються яйцеклітини у плідний період, з максимальною кількістю, приблизно, в 7 мільйонів на 6-й місяць її внутрішньоутробного розвитку. Після цього більшість яйцеклітин гине в яєчнику під час внутрішньоутробного, неонатального та статевого дозрівання. Тим не менш, ця запрограмована втрата яйцеклітин зберігає енергетичні ресурси, оскільки це відбувається до того, як відбувається ріст яйцеклітин [9].

1.1. Будова та склад хромосомного апарату людини

1.1.1. Організація геному людини

Основний будівельний матеріал: ДНК. Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) складається з чотирьох різних нуклеотидів. Кожен нуклеотид складається з цукру, який є дезоксирибозою в ДНК, фосфатної групи та основи. У нуклеотидах ДНК присутні чотири різні основи: аденін (А), цитозин (С), гуанін (G) і тимін (Т) (рис. 1.1). Ці чотири нуклеотиди з'єднані разом у довгі ланцюги ДНК, чергуючи цукор (з приєднаною основою) і фосфатну групу, де порядок різних основ визначає генетичний код (рис. 1.2). Фосфатна група може бути або зв'язана з 5'-вуглецем цукру, або з 3'-вуглецем цукру, тоді як основа зв'язана з 1'-вуглецем. Коли перший цукор у ланцюзі ДНК з'єднаний разом, він має вільний 5'-вуглець, тоді як його 3'-вуглець ковалентно зв'язаний з фосфатною групою. Ця фосфатна група зв'язується далі по нитці з 5' наступного цукру. Ось чому в ланцюзі ДНК 5' -вуглець першого цукру вільний, а на кінці ланцюга 3' -вуглець останнього цукру вільний. Ось чому пари основ ДНК завжди зчитуються від 5' до 3' [10, 11].

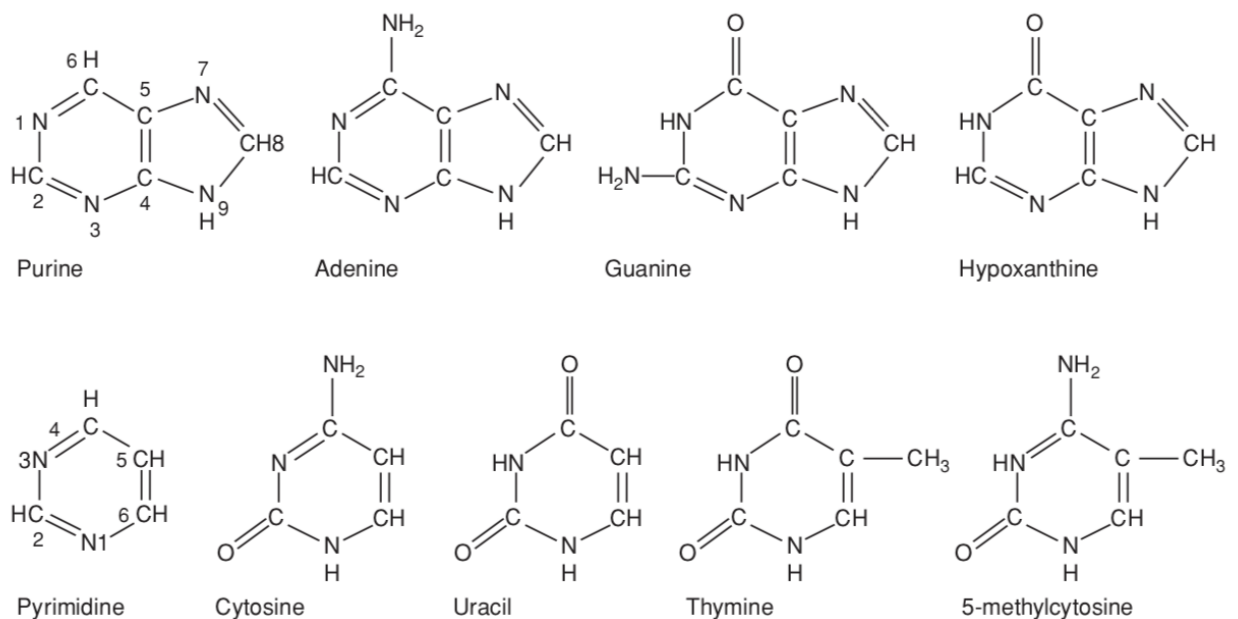


Рис. 1.1. Чотири основи в ДНК та РНК

Крім того, клітинна ДНК зазвичай знаходиться у формі подвійної спіралі. Основи А і Т, з одного боку, і С і G, з іншого боку, комплементарні одна одній та об'єднуються в пари, утворюючи водневі зв'язки, таким чином стабілізуючи подвійну спіраль (рис. 1.3). Згідно з базою даних Ensembl [12], наша ядерна ДНК містить 3 287 209 763 пар основ (bp). Приблизно половина геному людини складається з транспозонів, також відомих як мобільні елементи ДНК або «стрибучі гени».

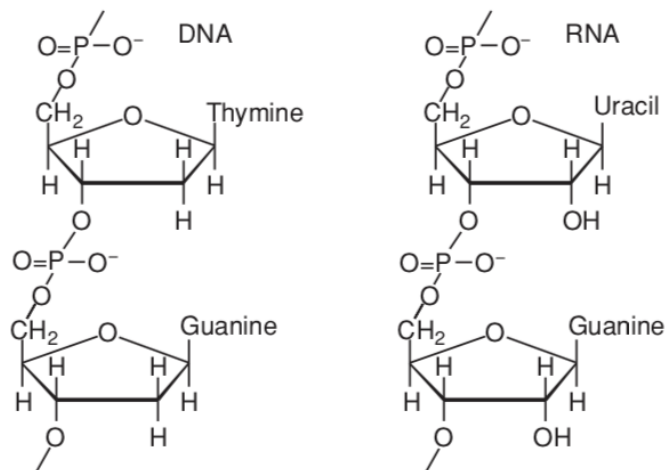


Рис. 1.2. Цукрово-фосфатний каркас нуклеотидів. ДНК містить 2'-дезоксирибозу як цукор, РНК містить рибозу як цукор

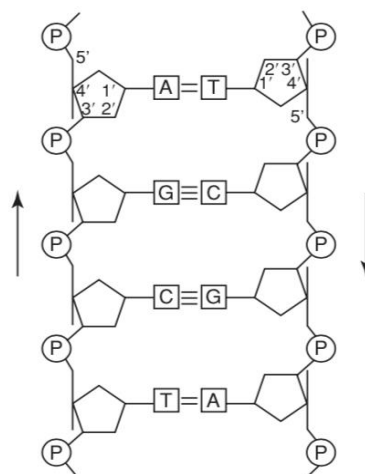
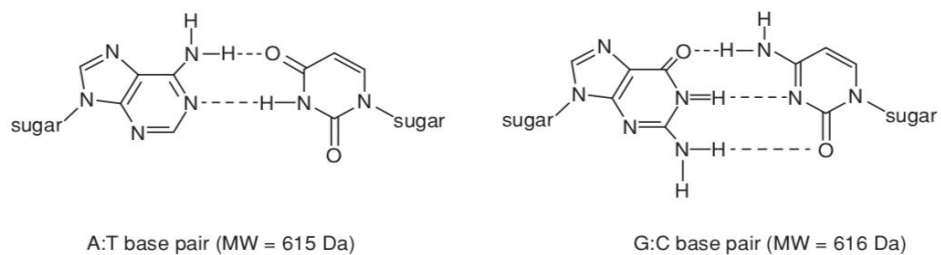


Рис. 1.3. Водневі зв'язки в молекулі ДНК

А і Т утворюють два водневі зв'язки, тоді як G і C утворюють три водневі зв'язки. Разом із цукрово-фосфатним каркасом це утворює подвійну спіраль ДНК.

ДНК організована в хромосомах. ДНК усього нашого геному не впорядкована в один довгий ланцюг і не лежить оголеною та незахищеною в ядрах наших клітин. Ядерна ДНК складається з 46 окремих ланцюгів, тому кожна хромосома містить один довгий ланцюг ДНК. Двадцять дві з цих хромосом є парними, одна успадкована від матері, а друга – від батька. Вони називаються аутосомами.

Дві хромосоми, що залишилися, є статевими хромосомами: жінки мають дві Х-хромосоми, тоді як чоловіки мають одну Х-хромосому та одну меншу Y-хромосому.

Коли клітина не ділиться, ДНК організована в хроматин. Подвійна спіраль обертається навколо білкових структур, які називаються октамерами гістонів, які, у свою чергу, згортаються в структури, які називаються соленоїдами. Ці соленоїди прикріплені до білкового каркаса всередині ядра, утворюючи петлі (рис. 1.4). Спосіб організації хроматину в конкретній клітині та те, як, наприклад, деякі гістони хімічно модифіковані, визначає, які гени можуть або не можуть бути транскрибовані та експресовані. Наприклад, деякі гени будуть настільки щільно упаковані в хроматині, що механізм транскрипції не зможе до них дістатися, і, таким чином, ці гени припиняються в цій конкретній клітині. Таким чином, структура хроматину є одним із визначальних чинників експресії клітини, а отже, і її функції [13].



Рис. 1.4. Організація ДНК в хроматин

Особливий тип ДНК можна знайти в мітохондріях. Мітохондрії – це клітинні органели, які необхідні для дихання та виробництва енергії клітиною. Вони несуть власну кільцеву ДНК приблизно 16 000 п.н., яка реплікується незалежно від ДНК у ядрі. Гени мітохондріальної ДНК кодують власну рибосомну РНК (рРНК), транспортну РНК (тРНК) та рибосомні білки, а також декілька ферментів аеробного метаболізму. Однак багато мітохондріальних білків кодуються ядерною ДНК і пізніше імпортуються в мітохондрію для сприяння мітохондріальній функції [13].

Ген можна визначити як «послідовність ДНК» у геномі, необхідну для виробництва функціонального продукту, який може бути поліпептидом або функціональною молекулою РНК. Кількість генів у нашому геномі оцінюється приблизно в 25000 [12]. Вони нерівномірно розкидані вздовж хромосом: деякі частини хромосом дуже багаті генами, тоді як інші ділянки з понад мільйона пар основ узагалі не містять генів і називаються генними пустелями.

Гени, які зазвичай кодують поліпептид, мають повторювані структурні особливості. Не всі пари основ у гені будуть транслюватися в білок: гени зазвичай містять екзони, які є трансльованими частинами, вкрапленими інтронами, які не транслюються. У багатьох генах інтрони становлять значно більшу частку гена, ніж екзони. Іншими повторюваними структурними особливостями є послідовності, збережені серед багатьох різних генів, які

дають механізму транскрипції клітини відповідні сигнали про те, коли й де слід транскрибувати конкретні гени. Кожен ген має стартовий і стоп-сигнал, а також промоторну послідовність на 5'-кінці. Цей промотор визначає шаблон, а також рівень експресії гена. Інші регуляторні елементи включають енхансери, сайленсери та ділянки контролю локусів, і вони можуть бути або в 5', або 3' нетрансльованій області, або в інтронних послідовностях гена. Деякі можуть навіть лежати далеко від кодуючої послідовності гена [14].

Алелі є альтернативними формами одного гена: зміни в послідовності ДНК призведуть до іншого білка з іншою функцією. Добре відомим прикладом кількох алелів є система груп крові АВО.

Кожна клітина людини містить 23 пари гомологічних хромосом, що становить 46 хромосом. Кожен набір з 23 хромосом називається гаплоїдним набором. Коли клітина має два повних набори, вона описується як диплоїдна [12].

1.1.2. Фази клітинного циклу

Щоб дістатися від заплідненої зиготи до приблизно 100 трильйонів клітин в людському тілі, клітинам необхідно постійно ділитися. Поділ клітин і мітоз також мають вирішальне значення для диференціювання.

Коли клітина не перебуває в мітозі, кажуть, що вона перебуває в інтерфазі (рис. 1.5 А, В). Перша частина інтерфазі, відразу після мітозу, називається фазою G1. У цій фазі кожна хромосома містить лише одну копію ланцюга ДНК. Ця фаза G1 зазвичай триває кілька годин, поки не буде досягнута фаза S, хоча деякі кінцево диференційовані клітини (нейрони або лейкоцити) можуть узагалі вийти з клітинного циклу та, як кажуть, перебувають у G0.

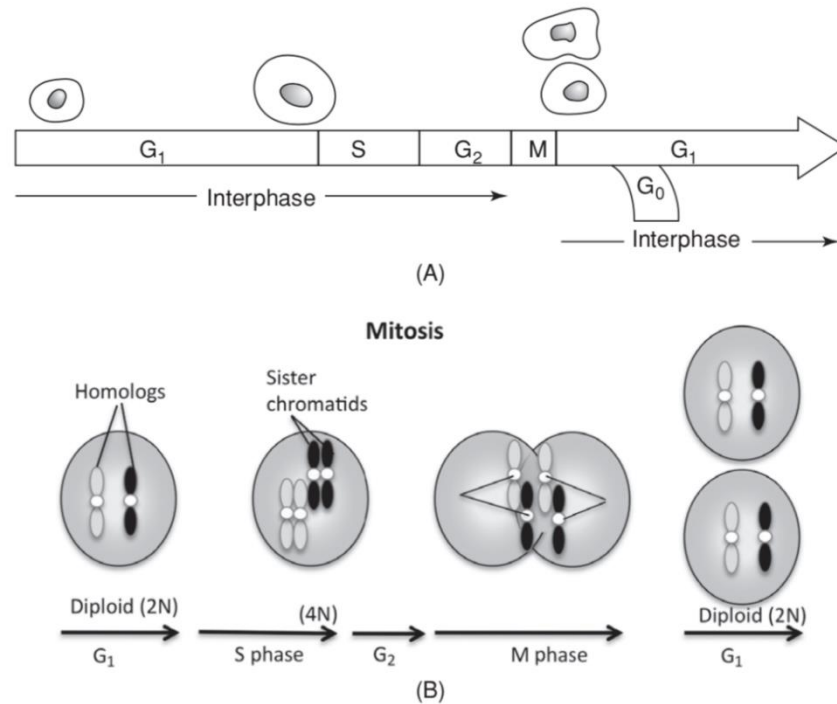


Рис. 1.5. (А) Клітинний цикл соматичної клітини та (В) різні етапи мітозу

Коли клітина починає відтворювати свою ДНК, вона переходить у S-фазу. Два ланцюги ДНК розділяються, і з кожного ланцюга складається комплементарний ланцюг. Хромосоми в кінці S-фази складаються з двох сестринських хроматид, кожна з яких містить ідентичний ланцюг ДНК. Хроматиди утримуються разом на центромері, яка, зв'язана зі спеціалізованими білками, утворює кінетохор, за допомогою якого хроматиди будуть прикріплені до мітотичного веретена. Перш ніж клітина вступить у мітоз, вона проходить через коротку контрольну фазу G₂, у якій відбувається ріст клітини після накопичення синтезованих білків протягом усього клітинного циклу. Повна інтерфаза типової клітини триває від 16 до 24 годин, але може тривати до місяців, тоді як мітоз завершується за кілька годин.

Наприкінці G₂ кожна хромосома складається з двох хроматид, і одна з цих хроматид повинна опинитися в одній із дочірніх клітин у впорядкованій сегрегації хромосом. Першим етапом мітозу є профаза, під час якої хромосоми починають конденсуватися та починає формуватися мітотичне веретено (див. рис. 1.6 А, В). Формування мітотичного веретена організовано через дві

центросоми, з яких мікротрубочки випромінюють, утворюючи веретено. Під час прометафази ядерна мембрана розпадається, і хромосоми своїм кінетохором прикріплюються до мітотичного веретена. Керовані мікротрубочками веретена поділу, хромосоми рухаються до метафазної пластинки в процесі, який називається конгресією. Під час метафази хромосоми досягають максимальної конденсації в екваторіальній площині, і їх найлегше візуалізувати. Анафаза починається, коли хромосоми поділяються на дві хроматиди і кожна хромосома переміщується до різних полюсів. Мітоз завершується телофазою, під час якої відбувається деконденсація хромосом і відновлення ядерної мембрани, цей процес називається каріокінезом. Одночасно з телофазою цитоплазма поділяється на дві дочірні клітини, і каріокінез завершується [10].

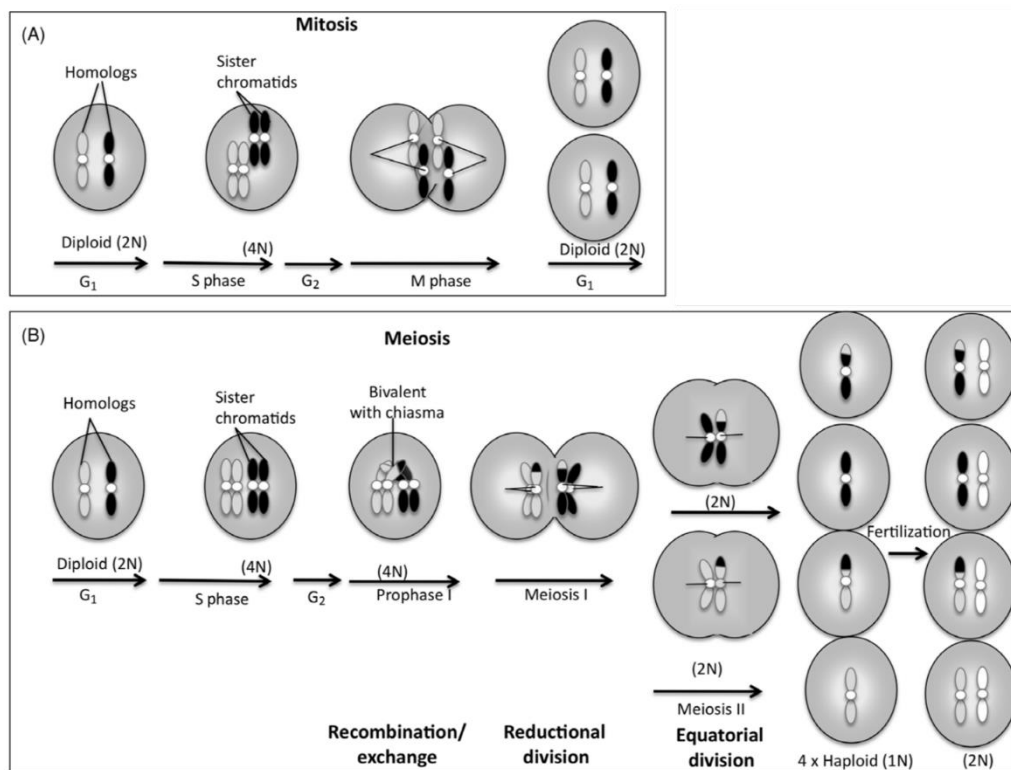


Рис. 1.6. Сегрегація хромосом при мітозі (А) і мейозі (В). Сірі та чорні хроматиди (А, В) символізують гомологи батька та матері

Слід зауважити, що під час мітотичної М-фази/анафази сестринські хроматиди роз'єднуються (А), тоді як у мейозі I дві гомологічні материнські та

батьківські хромосоми відокремлюються одна від одної редуційно за допомогою обох сестринських хроматид (В).

У процесі мітозу утворюються дві дочірні клітини, які несуть однакову генетичну інформацію як за вмістом, так і за об'ємом. Таким чином, мітоз не може бути використаний для утворення гамет, оскільки з кожним поколінням кількість ДНК подвоюється. Мейоз як спеціалізована форма клітинного поділу вирішує цю проблему, утворюючи клітини (гамети) лише з половиною вмісту ДНК, тобто по одній із кожної хромосоми, соматичних клітин. Додатковим бонусом є те, що під час мейозу ДНК двох батьківських хромосом обмінюється, щоб утворити нові хромосоми, побудовані з генетичного матеріалу двох батьків. Цей процес рекомбінації важливий для створення генетичної різноманітності виду і, таким чином, для забезпечення його еволюції. Мейоз є найважливішим кроком для виживання та еволюції видів, що розмножуються статевим шляхом [11].

Мейоз включає два послідовних поділу. Перша мейотична профаза (профаза 1) є тривалою й може бути розділена на кілька послідовних етапів: (1) лептотенові хромосоми довгі та тонкі; (2) під час зиготени гомологічні пари хромосом з кожного гаплоїдного набору лежать одна біля одної на частинах своєї довжини; (3) у пахітені хромосоми починають потовщуватись і вкорочуватись і стають більш тісними в парах по всій своїй довжині, у цей час відбувається синапсис, кросинговер і обмін хроматидами, а ядерця зникають; (4) при диплотені та діакінезі хромосоми ще більше вкорочуються та виявляють ознаки тісного зв'язку зі своїм гомологом у хіазмах, де відбувся кросинговер і взаємний обмін послідовностями ДНК, надаючи вигляд петлі або хреста. У мейотичній метафазі 1 ядерна мембрана руйнується, і гомологічні пари хромосом вирівнюються на екваторі веретена поділу. У мейотичній анафазі 1 гомологічні хромосоми рухаються в протилежних напрямках. У мейотичній телофазі 1 відбувається цитокінез; ядерна мембрана може тимчасово переформуватися, хоча це відбувається не завжди, утворюючи дві дочірні клітини з половиною кількості хромосом у кожній (лише один член кожної

гомологічної пари), але кожна хромосома складається з двох генетично унікальних хроматид (оскільки перехід на хіазмі). У другому мейотичному поділі ці хроматиди відокремлюються так само, як під час мітозу, утворюючи загалом чотири гаплоїдні нащадки вихідної клітини, кожна з яких містить лише один повний набір хромосом. Завдяки обміну хроматидами та випадковій сегрегації гомологічних хромосом кожна гаплоїдна клітина є генетично унікальною. Під час запліднення дві гаплоїдні клітини збираються разом, утворюючи нову диплоїдну зиготу [6].

1.2. Сучасні методи генетичного дослідження

Предімплантаційна генетична діагностика (PGD) є ранньою формою пренатальної діагностики для пар із високим ризиком передачі спадкових захворювань своїм нащадкам: або моногенних розладів, або структурних хромосомних аномалій. Її передбачувана мета – діагностувати конкретне генетичне захворювання в клітинах, узятих із біопсії ооцитів/зигот або ембріонів, отриманих *in vitro* за допомогою допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ), і після аналізу перенести в матку лише ті ембріони, які визначені як неуражені захворюванням. Перенесення ембріонів без генних чи хромосомних аномалій дає змогу запобігти народженню дитини з генетичними захворюваннями, знизити рівень репродуктивних втрат під час вагітності, а також підвищити ефективність циклів допоміжних репродуктивних технологій.

Доцільності ПГД сприяли розробки в репродуктивній медицині, генетиці та методах біотехнології. Едвардс і Гарднер успішно виконали першу відому біопсію кролячих ембріонів у 1968 році. У 1990 році було повідомлено про перше клінічне застосування ПГД на людях, де описано виключення Х-зчепленої хвороби за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) визначення статі ембріонів [16].

Близько 70% ембріонів (як у випадку природної вагітності, так і при ДРТ) не дають народження дитини через невиношування вагітності або порушення

процесу імплантації. Основною причиною цього є хромосомні аномалії (анеуплоїдії), що виявляються як втрата додаткової хромосоми або її частини [15].

Найчастіше причиною виникнення хромосомних аномалій є нерозходження хромосом у процесі дозрівання статевих клітин. Причому у 85% випадків анеуплоїдії пов'язані з порушеннями під час оогенезу і лише у 15% – зі сперматогенезом [17]. Більш рідкісними причинами є успадкування батьківської хромосомної патології та порушення в процесі дроблення зиготи.

При проведенні екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) перші етапи життя ембріону відбуваються *in vitro* (поза організмом матері), тому є можливість дослідити хромосоми [18].

У предімплантаційному генетичному тестуванні існує три підходи, що поділяються за походженням матеріалу, який аналізується:

— дослідження полярних тілець – редукційних клітинних утворень, які виникають при дозріванні яйцеклітини. Вони не відіграють ніякої ролі в подальшому розвитку ембріона й можуть бути вилучені без пошкодження яйцеклітини. Їх тестування дає непряму інформацію про хромосомний набір яйцеклітини, але не є гарантією її нормальності й уже, тим більше, не характеризує майбутній ембріон [19];

— дослідження бластомера – клітини ембріона на третю добу його розвитку (6–8-клітинна стадія). У цей час клітини ембріона не диференційовані й тому можливим є вилучення одного чи двох бластомерів. Генетичний аналіз вилучених бластомерів характеризує вже ембріон, але не виключає можливості його мозаїцизму. Крім того, у низці досліджень було показано, що біопсія бластомера на третю добу, на жаль, призводить до погіршення імплантаційного потенціалу ембріонів, тому цей підхід утрачає актуальність для клінічної практики [20];

— дослідження клітин трофктодерми – клітин ембріонального походження, що створюють зовнішню оболонку ембріона (рис. 1.7). З усіх наведених цей підхід є найбільш інформативним і враховує можливість мозаїцизму. Біопсія

трофектодерми дає змогу використовувати для діагностики кілька клітин, що різко підвищує ймовірність отримання молекулярно-генетичного висновку про тестований ембріон. Отримання клітин трофектодерми шляхом біопсії передбачає культивування ембріонів до 5–7-ї доби, а також кріоконсервування останніх на період аналізу. За результатами тестування, кріоконсервовані ембріони можуть бути використані в подальшому в кріоциклах ДРТ. Дослідження свідчать про те, що проведення біопсії трофектодерми ембріона не спричиняє негативного впливу на його подальший розвиток [21].

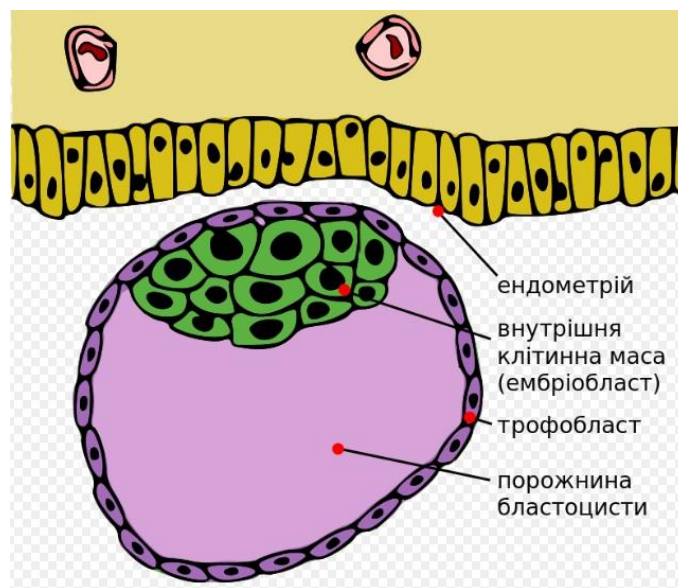


Рис. 1.7. Будова бластоцисти

Генетичне тестування можна проводити за допомогою різних молекулярно-генетичних методів:

- полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), причому виключно у випадках носійства моногенної патології: муковісцидозу, фенілкетонурії, спінальної м’язової атрофії, хореї Гентингтона тощо;

- флуоресцентної гібридизації, *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization — FISH)

- діагностики виявлення анеуплоїдії та деяких структурних хромосомних перебудов. Із технічних причин цей тип діагностики дозволяє одночасно досліджувати лише обмежену кількість хромосом, зазвичай 3 чи 5. Тому при

скринінгу анеуплоїдії FISH-діагностика поступається за інформативністю методам із повногеномною ампліфікацією (ПГГ, NGS);

- порівняльної геномної гібридизації (ПГГ), що виконується для повногеномного скринінгу анеуплоїдії у випадках множинних невдалих циклів ДРТ, наприклад, звичного невиношування вагітності [22];

- секвенування наступного покоління, або NGS (next generation sequencing) (рис. 1.8, рис. 1.9), – методу, що дає змогу отримати інформацію про кількісні порушення в усіх хромосомах, а також про наявність точкових мутацій.

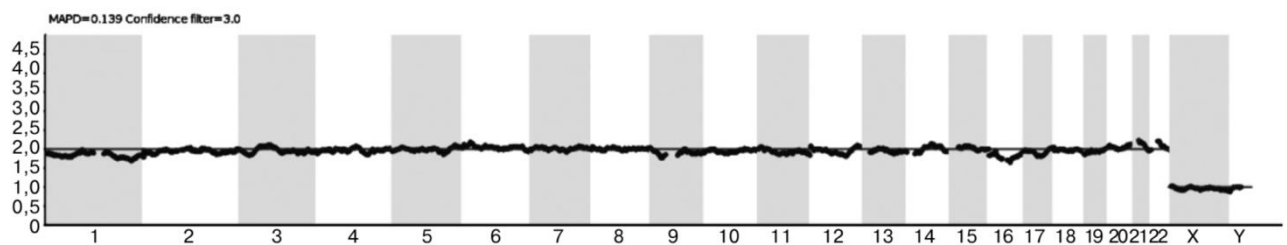


Рис. 1.8. Ембріон із нормальним хромосомним набором (46, XY)

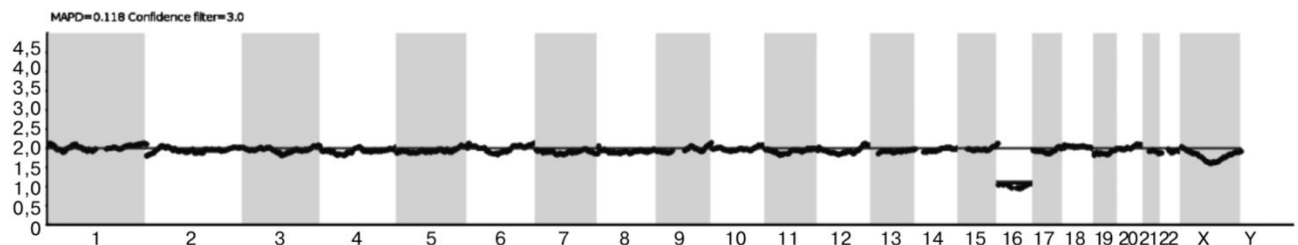


Рис. 1.9. Анеуплоїдний ембріон із моносомією хромосоми 16

Вибір тактики діагностики визначається в кожному конкретному випадку на основі анамнезу безпліддя, стану організму матері, ембріонів та їхньої кількості.

Причини хромосомних порушень при утворенні гамет залишаються недостатньо вивченими. Водночас до чинників таких порушень належить вік жінки, оскільки з його збільшенням підвищується ризик анеуплоїдії ооцитів. У результаті цього підвищується ймовірність народження дитини з хромосомними аномаліями, зокрема із синдромом Дауна. Тому для пацієнток

старшої вікової групи під час виконання ДРТ рекомендується проведення ПГТ на анеуплоїдії (ПГТ-А).

Анеуплоїдії також трапляються в ембріонах пацієнок молодого репродуктивного віку. У зв'язку з цим подружня пара може проводити ПГТ-А у лікувальному циклі ЕКЗ для зниження ризику хромосомних порушень, спонтанного переривання вагітності та народження дитини без хромосомної патології [23].

1.3. Причини та наслідки генетичних захворювань людини

Хромосомні аномалії

Хромосомні аномалії традиційно визначаються як зміни, які викликають видимі зміни в хромосомах. Більш функціональне визначення – це будь-яка аномалія, яка виникає внаслідок певних хромосомних механізмів, таких як неправильна сегрегація хромосом під час мітозу чи мейозу, або неправильне відновлення розірваних хромосом, або неправильна рекомбінація. Хромосомні аномалії можуть бути конституційними, тобто вони присутні в кожній клітині особи, або особа може бути мозаїчною, що означає наявність двох або більше клітинних ліній, що походять від однієї зиготи. У постнатальній цитогенетиці зазвичай аналізують лише дві клітинні лінії, але, доімплантаційні ембріони можуть нести багато різних клітинних ліній, і тому їх називають хаотичною мозаїкою.

Розрізняють дві категорії аномалій: хромосомні аномалії зі зміненим числом копій, тобто числові аномалії, та структурні аномалії, коли хромосоми демонструють аномальну структуру.

Кількісні аномалії

Триплоїдія та тетраплоїдія є формами поліплоїдії, тобто всі клітини особи несуть відповідно три або чотири гаплоїдні геноми. Триплоїдія зазвичай спричинена заплідненням ооцита двома сперматозоїдами, тоді як тетраплоїдія

зумовлена неповним першим поділом: ДНК реплікується до $4N$, але клітина не ділиться. І триплоїдія, і тетраплоїдія смертельні.

Анеуплоїдія означає, що одна або кілька окремих хромосом або відсутні, або присутні з додатковою копією. Найвідомішою трисомією є синдром Дауна, де присутня одна зайва хромосома 21 (47, XY, +21). Моносомія є летальною в ембріональному періоді, за винятком моносомії X-хромосоми, як, наприклад, при синдромі Тернера (45,X). Одним із механізмів виникнення анеуплоїдних клітин є нероз'єднання, яке може виникнути під час мейозу, що призводить до аномальних гамет, або під час мітозу, що призводить до мозаїцизму. Під час мейозу спарені хромосоми не можуть відокремитися або сестринські хроматиди не можуть роз'єднатися під час мітозу. Іншим механізмом є відставання в анафазі, коли хромосома або хроматида відстає від інших хромосом під час руху в анафазі та втрачається.

Наслідки кількісних аномалій жахливі: нулісомії та моносомії (за винятком синдрому Тернера) ніколи не є життєздатними, тоді як особи з трисоміями 13, 18 призводять до загибелі дитини найближчим часом після народження. І тільки з трисомією 21 можуть досягти дорослого життя. Статеві хромосоми знову становлять виняток: відомо, що 47,XXX, 47,XXY і 47,XYY викликають дуже незначні клінічні проблеми, і ці люди мають нормальну тривалість життя.

Хромосомні перебудови

Розриви хромосом можуть бути спричинені пошкодженням ДНК або неправильною рекомбінацією під час мейозу. Клітинні механізми намагатимуться відремонтувати ці розриви шляхом повторного з'єднання кінців або додавання теломерів до кінців. Якщо такі механізми відновлення призводять до хромосоми без центромери, тобто ацентричної хромосоми або дицентричної хромосоми, ці хромосоми будуть втрачені під час сегрегації в наступному мітозі.

Коли в одній хромосомі відбуваються два розриви, фрагмент може бути втрачений (делеція), або вставлений після повороту фрагмента (інверсія), або включений у кільцеву хромосому (кільцева хромосома).

Коли дві хромосоми зазнають одного розриву, отримані фрагменти можуть обмінюватися. Це називається транслокацією. Якщо відбувається обмін ацентричними фрагментами, це призводить до стабільної центральної хромосоми, яка може передаватися в мітозі, і це називається реципрокною транслокацією (див. рис. 1.10). Будь-який ацентричний або дицентричний продукт, що виникає в результаті обміну, або центричний і ацентричний фрагменти втрачаються під час мітозу.

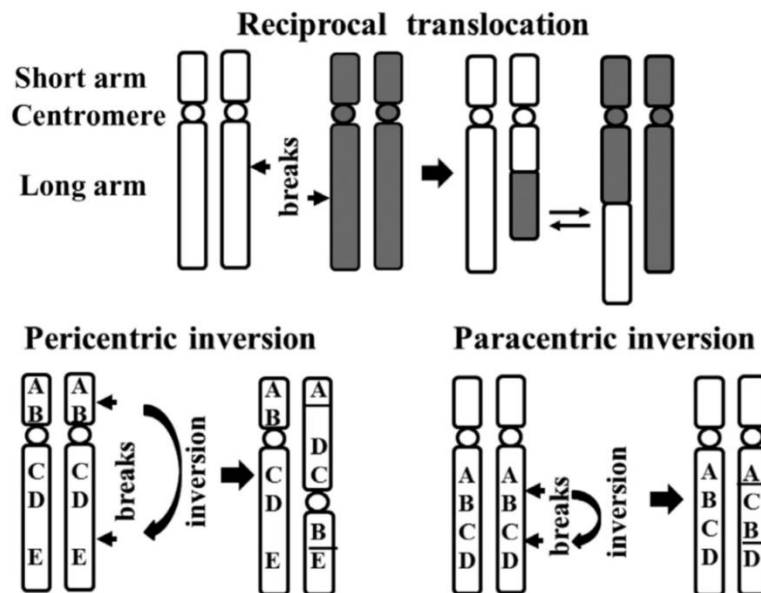


Рис. 1.10. Збалансовані структурні перебудови хромосом

Між негомологічними хромосомами можуть відбуватися реципрокні транслокації. Розриви в ДНК (наконечники стрілок) у двох різних хромосомах з подальшим обміном хромосомних сегментів дистальніше розриву призведуть до двох похідних хромосом. Парацентричні та перичентричні інверсії пов'язані з двома точками розриву на одній хромосомі (стрілки). Збалансовані перебудови можуть порушити функції генів у точках розриву транслокації та спричинити хромосомно аномальне потомство та повторні викидні.

Робертсонівські транслокації – це особливий тип транслокації, що включає дві хромосоми 13, 14, 15, 21 або 22. Ці хромосоми мають дуже маленькі короткі руки, які дуже схожі за послідовністю ДНК. Коли короткі плечі двох із цих хромосом розриваються, ацентричні та центричні фрагменти міняються, у результаті чого утворюються ацентричні та дицентричні фрагменти. Ацентричний фрагмент втрачається, тоді як у дицентричному фрагменті центромери розташовані настільки близько одна до одної, що вони зливаються й утворюють одну велику центромеру (центричне злиття). Ця хромосома стабільна під час мітозу.

Особи, які несуть збалансовану перебудову, мають нормальний фенотип. Однак гамети носіїв стикаються з проблемами при вступі в мейоз. Як описувалося раніше, для того, щоб пройти через мейоз, хромосоми повинні спаритись, щоб уможливити рекомбінацію. Клітина, яка несе дві аномальні хромосоми, повинна сформувати спеціальні структури, щоб забезпечити спарювання аномальної хромосоми з нормальними хромосомами. У носія робертсонівської транслокації може утворюватися не менше шести різних гаплоїдних клітин. Лише одна з цих гамет призведе до нормальної особи, тоді як друга призведе до збалансованої (і, отже, нормальної) особи; інші чотири призведуть або до моносомії, або до трисомії [13].

Моногенні захворювання

Способи передачі

Спосіб передачі моногенного захворювання в основному залежить від двох факторів: по-перше, домінантне чи рецесивне це захворювання, по-друге, локалізується ген в аутосомі або в статевій хромосомі (переважно Х-хромосомі) [24]. При аутосомно-рецесивних розладах носії мають нормальний фенотип, тоді як хворіють лише гомозиготні носії захворювання. Здебільшого це можна пояснити тим фактом, що рецесивні мутації зазвичай є мутаціями втрати функції. Якщо одна копія гена, що кодує фермент, буде видалена, друга копія подбає про те, щоб залишилася достатня кількість активності ферменту. Однак якщо обидві копії вимкнені, то людина, яка є носієм цієї хвороби, страждає. Це

пояснює, чому при рецесивних захворюваннях обоє батьків ураженої дитини є фенотипово нормальними носіями. Деякі з найбільш поширених аутосомно-рецесивних захворювань – це гемохроматоз і муковісцидоз у європеїдних популяцій, серповидноклітинна анемія в африканських популяціях і бета-глобінопатії в середземноморських країнах.

При аутосомно-домінантному успадкуванні страждають особи, які несуть лише одну копію дефектного гена. Гени, відповідальні за захворювання, часто несуть мутацію посилення функції. Білок, який синтезується з гена, викликає проблеми, наприклад, при хворобі Хантінгтона, оскільки аномальний білок утворює токсичні агрегати. Утрата функції також може призвести до домінантної передачі, якщо існує так звана гаплонедостатність, тобто одна копія гена не виробляє достатньо білка для нормального функціонування. Іншими відомими прикладами аутосомно-домінантних захворювань є нейрофіброматоз (хвороба фон Реклінгхаузена, відомого як Людина-слон) і міотонічна дистрофія, або хвороба Штейнерта.

Моногенні захворювання, що лежать на X-хромосомі, мають особливий шлях передачі, оскільки жінки є носіями двох X-хромосом, а чоловіки лише однієї. Таким чином, у пацієнтів чоловічої статі мутації в одній X-хромосомі не збалансовані другою X-хромосомою, як у жінок. Тут також існує як рецесивний, так і домінантний типи успадкування. Прикладами добре відомих рецесивних X-зчеплених захворювань є дальтонізм (дуже поширений, але досить нешкідливий) і гемофілія. Домінантні X-зчеплені розлади досить рідкісні. Одним із яскравих прикладів є пігментна інконтиненція: у хворих чоловіків захворювання зазвичай закінчується летальним результатом у внутрішньоутробному періоді, тоді як у хворих жінок спостерігаються аномалії шкіри, волосся та центральної нервової системи, а також високий рівень перекосу X-хромосоми. Це пояснюється тим, що клітини з активною хромосомою, що несуть мутацію, втрачаються під час народження. Синдром крихкої X-хромосоми також класифікується як домінантний. Моносомія у живонароджених зустрічаються тільки за хромосомою X (синдром

Шерешевського-Тернера), оскільки більшість моносомій за іншими хромосомами набору (Y-хромосомою та аутосомами) гинуть на дуже ранніх етапах внутрішньоутробного розвитку. Трисомії в живонароджених зустрічаються по X, 8 (синдром Варкани), 9, 13 (синдром Патау), 14, 18 (синдром Едвардса), 21 (синдром Дауна) і 22 хромосомам. Ембріони з множинними хромосомними вадами не є життєздатними [13].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено в клініці репродуктивної медицини імені академіка В. І. Грищенка (м. Львів), де впроваджено технологію ПГТ-А. Робота виконана згідно Договору про науково-практичне співробітництво між ТОВ «Клініка репродуктивної медицини імені академіка В.І. Грищенка» та КЗ «Харківський ліцей № 116 Харківської міської ради» (Додаток А).

У дослідженні обстежено 230 пацієнток, яких залежно від віку розділили на п'ять груп і яким у протоколі ЕКЗ було проведено ПГТ-А.

Дані обстеження пацієнток отримані згідно «Пояснювальної записки щодо умов передачі даних від ТОВ «Клініка репродуктивної медицини імені академіка В. І. Грищенка» до учениці 10-А класу КЗ «Харківський ліцей № 116 Харківської міської ради» Денисенко Д. Є.» (Додаток Б).

У I групу ввійшло 6 пацієнток у віці до 25 років.

У II групу 59 пацієнтів у віці 25-30 років.

У III групу 143 пацієнтки у віці 31-35 років.

У IV групу 116 пацієнток у віці 36-40 років.

У V групу 49 пацієнток у віці 41 + років .

ПГТ-А виконувалося в програмі ЕКЗ після запліднення яйцеклітин шляхом інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда (ICSI). Біопсія трофодерми (рис. 2.1) ембріонів на стадії бластоцисти виконувалася на п'ятий або шостий день культивування за допомогою мікроманіпулятора Erpendorf NK2 (Німеччина) та лазера RI Saturn 3 (Велика Британія).

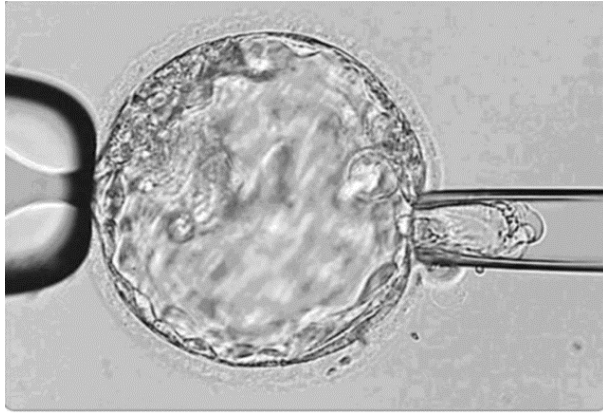


Рис. 2.1. Біопсія трофектодерми

Отримані клітинні біоптати досліджувалися за допомогою методу NGS (секвенатор Ion S5, Termo Fisher Scientific, США).

Для статистичної обробки отриманих даних використовували пакет прикладних програм Statistica 10,0 фірми StatSoft Inc. (США) для персонального комп'ютера за програмою в операційному середовищі Statistica for Windows і за прикладними програмами Excel. Вірогідність відмінностей визначали за t -критерієм Стьюдента.

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ ЧАСТОТИ ХРОМОСОМНИХ ПОРУШЕНЬ

ЕМБРІОНІВ У ЖІНОК РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП ЗА ДОПОМОГОЮ

ПРЕДІМПЛАНТАЦІЙНОЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ

3.1. Частота нормальних ембріонів та ембріонів з різними генетичними порушеннями в жінок різних вікових груп

У дослідженні всіх жінок, як було зазначено, розділено на п'ять груп в залежності від віку:

- I група – до 25 років,
- II група – 25-30 років,
- III група – 31-35 років,
- IV група – 35-40 років,
- V група – 41+ років.

У жінок, які ввійшли до першої групи, було отримано 19 біоптатів, у другій – 190 біоптатів, у третій – 415 біоптатів, у четвертій – 292 біоптати, у п'ятій – 109 біоптатів.

У дослідженні було проведено порівняльний аналіз частоти нормальних ембріонів залежно від віку жінок при використанні ПГТ-А у циклах ЕКЗ (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Частота нормальних ембріонів та ембріонів з різними генетичними порушеннями в жінок різних вікових груп

	I група (до 25) (n=19)	II група (25-30) (n=190)	III група (31-35) (n=415)	IV група (36-40) (n=292)	V група (від 41) (n=109)
Нормальний ембріон, %	73 (14)	51 (97)	51 (211)	31 (90)	14* (15)

Продовження таблиці 3.1

Моносомія, %	5,26 (1)	2,1 (4)	6,75 (28)	13,7 (40)	25,7* (28)
Трисомія, %	-	4,2 (8)	4,8 (20)	11,6 (34)	13** (14)
Множинні хромосомні вади, %	-	18,9 (36)	17,1 (71)	23,3 (68)	37,6*** (41)

Примітка: вірогідна різниця в порівнянні з I групою з рівнем значущості

* $p = 0,37$; ** $p=0,3$; *** $p=0,2$.

Отримані дані свідчать про те, що частота отримання нормальних ембріонів прогресивно зменшується з віком жінки (рис. 3.1). Найбільший показник (51%) нормальних ембріонів спостерігався в II та III групах, у яких вік пацієток становив від 25 до 35 років, а найнижчий — у V групі (14 %) з віковим періодом від 41 року (рис 3.1).

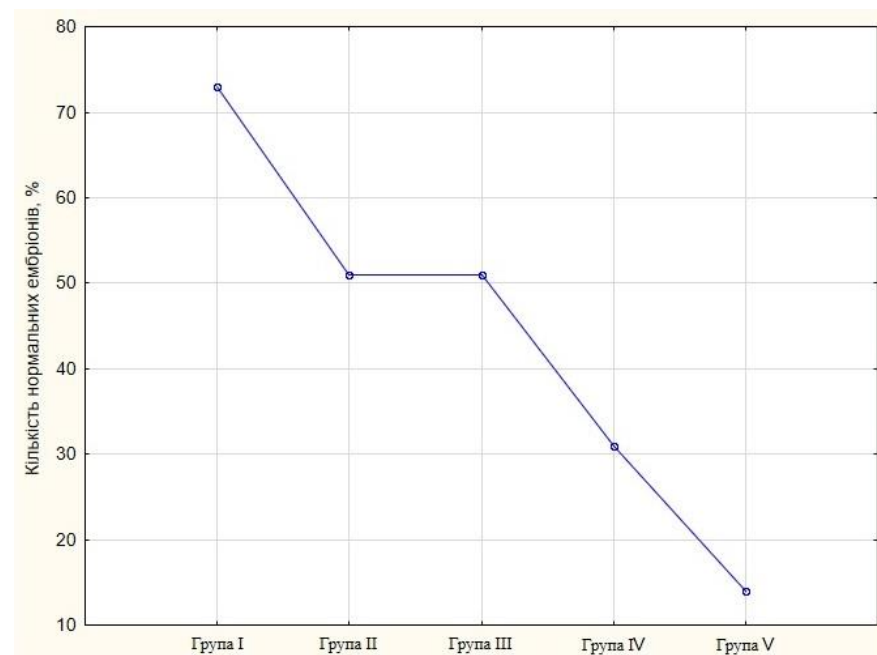


Рис. 3.1. Залежність кількості нормальних ембріонів від віку жінки (групи I-V)

3.2. Дослідження частоти хромосомних аномалій

Досліджено й частоту різних хромосомних аномалій, зокрема моносомій, трисомій та множинних хромосомних вад, залежно від віку жінки (рис. 3.2). Так, найменший показник моносомій спостерігався в I групі (вік до 25) 5,26%, а найвищий – у V групі (вік від 41) й становив 25,7%. Стосовно трисомій та множинних хромосомних вад найнижчі показники були в II (вік 25-30) та III (вік 31-35) групах та склали відповідно в разі трисомій 4,2% та 4,8%, а у випадках множинних хромосомних вад – 18,9% та 17,1%. Найвищий показник трисомій та множинних хромосомних вад був у V групі (вік від 41) та складав відповідно 13% та 37,6%. Слід зазначити, що в I групі (вік до 25) випадків отримання ембріонів з трисоміями або множинними хромосомними вадами не відмічалось.

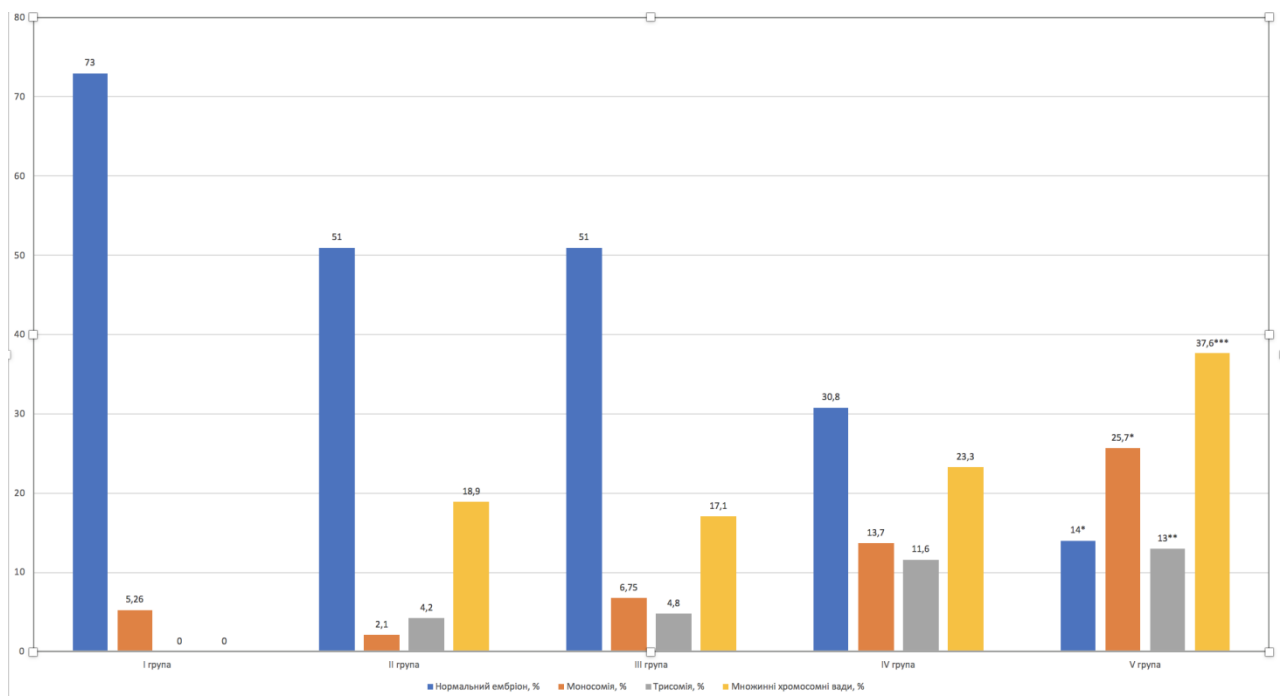


Рис. 3.2. Частота виявлення ембріонів з нормальним генотипом та хромосомними порушеннями в жінок різних вікових груп

Примітка: вірогідна різниця у порівнянні з I групою з рівнем значущості
 * $p = 0,37$; ** $p = 0,3$; *** $p = 0,2$.

Отримані дані збігаються з матеріалами наукових досліджень [25], де автори проаналізували залежність отримання нормального ембріона від віку жінки.

ВИСНОВКИ

ПГТ-А з використанням секвенування нового покоління є новим напрямком генетичного тестування й дає можливість вивчати хромосомні порушення ембріонів людини.

1. З'ясовано, що предімплантаційне генетичне тестування анеуплоїдій є сучасним та ефективним методом виявлення хромосомних аномалій на ранніх етапах розвитку (виявлення кількісних порушень хромосом – анеуплоїдій), метою якого є відбір здорового ембріона для проведення ембріотрансферу.
2. Встановлено, що частота отримання нормальних ембріонів відрізняється в жінок різних вікових груп та суттєво зменшується в жінок старшого репродуктивного віку.
3. Визначено, що з віком суттєво зростає кількість ембріонів з різними генетичними порушеннями (моносомії, трисомії та множинні хромосомні вади): найменший показник моносомій спостерігався в I групі (вік до 25) 5,26%, а найвищий – у V групі (вік від 41) й становив 25,7%.
4. Найнижчі показники трисомій та множинних хромосомних вад були в II (вік 25-30) та III (вік 31-35) групах та склали відповідно в разі трисомій 4,2% та 4,8%, а у випадках множинних хромосомних вад – 18,9% та 17,1%. Найвищий показник трисомій та множинних хромосомних вад був у V групі (вік від 41) та складав відповідно 13% та 37,6%. Слід зазначити, що в I групі (вік до 25) випадків отримання ембріонів з трисоміями або множинними хромосомними вадами не відмічалось.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Медична генетика: підруч. для студ. вищ. мед. (фарм.) навч. закл. III-IV р. акр. (МОЗ України) / О. Я. Гречаніна, Г. Хоффман, Р. В. Богатирьова та ін. ; за ред. О. Я. Гречаніної, Р. В. Богатирьової, О. П. Волосовця. - К. : Медицина, 2007. - 536 с.
2. Сучасні проблеми спадковості: Конспект лекцій / Т.Я. Шевчук, О.В. Коржик. – Луцьк.: ПП Іванюк В.П., 2020. –126 с.
3. Медична генетика: навчально-методичний посібник для студентів ВНЗ / В.Е. Маркевич, М.П. Загородній, І.Е. Зайцев, А.М. Лобода, І.В. Тарасова. – Суми: Сумський державний університет, 2011. - 363 с.
4. Здоров'я людини і сучасні біомедичні технології : навч. посібник для студентів вищ. мед. навч. закладів / Ж. Д. Семидоцька, І. О. Чернякова, А. Б. Борзенко ; за ред. Ж. Д. Семидоцької. – Харків : ХНМУ, 2020. – 96 с.
5. Infertility and Assisted Reproduction / R. Botros, J. A. Garcia-Velasco, H. Sallah, A. Marrigiannaris.— Cambridge Academ, 2008.— 806 p.
6. Johnson, M. H. Essential reproduction / Martin H. Johnson. – 7th ed.
7. Загальна біологія: Підруч. для 11 кл. загальноосвіт. навч. закл. / М. Є. Кучеренко, Ю. Г. Вєрвєс, П. Г. Балан, В. М. Войціцький. 3-є вид.- К.: Генеза, 2006.- 272 с.: іл.
8. Біологія і екологія: підручник для 10 класу закладів загальної середньої освіти / Р. В. Шаламов, Г. А. Носов, М. С. Каліберда, А. В. Комісаров — Харків: Соняшник, 2018. — 312 с.: іл.
9. Загальна екологія та неоекологія : підручник для студентів екологічних спеціальностей вищих навчальних закладів / В. Ю. Некос, А. Н. Некос. Т. А. Сафранов,— Х. : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2010. – 588 с.
10. Strachan T, Read A. Human Molecular Genetics, 4th edn. New York, NY: Garland Science, 2010
11. Nussbaum R, McInnes R, Willard HF. Thompson and Thompson Genetics in Medicine, 7th edn. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2007, p. 28.

12. Ensembl project: www.ensembl.org
13. Textbook of Human Reproductive Genetics, eds Karen Sermon and Stephane Viville. Published by Cambridge University Press. © Cambridge University Press 2014.
14. Ringo J. Fundamental Genetics. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2004.
15. A new approach to chromosomal abnormalities in sperm from patients with oligoasthenoteratozoospermia: detection of double aneuploidy in addition to single aneuploidy and diploidy by five-color fluorescence in situ hybridization using one probe set / H. G. Durak-basi-Dursun, A. G. Zamani, K. C. Ruhusen [et al.] // *Fertil. Steril.*— 2008.— Vol. 89 (6).— P. 1709–1717.
16. Оцінка ефективності предімплантаційного генетичного тестування на анеуплоїдії при використанні екстракорпорального запліднення у пацієнток старшого репродуктивного віку/ М.Г. Гріщенко, А.С. Луцький, В.Ю. Паращук, О.І. Правдюк, О.В. Ігнатов// Міжнародний медичний журнал, 2018, №3.
17. A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia / R. H. Martin, A. W. Rademaker, C. Greene [et al.] // *Biol. Reprod.*— 2003.— Vol. 69.— P. 535–539.
18. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome / C. Rubio, M. Gil-Salom, C. Simon [et al.] // *Hum. Reprod.*— 2001.— Vol. 16.— P. 2084–2092.
19. Brown R. The clinical benefit and safety of current and future assisted reproductive technology / R. Brown, J. Harper // *Reproductive Biomedicine Online.*— 2012.— Vol. 25.— P. 108–117.
20. Prognostic value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis over PGD / M. Sanchez-Castro, A. R. Jimenez-Macedo, M. Sandalinas, J. Blanco // *Hum. Reprod.*— 2009.— Vol. 24 (6).— P. 1516–1521.
21. Blastomere biopsy for PGD delays embryo compaction and blastulation: a time-lapse microscopic analysis / L. Bar-El, Y. Kalma, M. Malcov [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.*— 2016.— Vol. 33 (11).— P. 1449–1457.

22. Analysis of chromosomal abnormalities and structural changes of placenta with placenta after the use of assisted reproductive technologies / N. V. Aleksandrova, E. A. Dubova, O. A. Doronina, A. I. Shchegolev // Bulletin of Peoples Friendship University of Russia. Series «Medicine. Obstetrics and Gynecology».— 2012.— Vol. 5.— P. 96–103.

23. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping cross-overs between parental haplotypes / F. Y. Handyside, G. L. Harton, B. Mariani [et al.] // J. Med. Genet.— 2009.— Vol. 25.— P. 651–658.

24. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): www.omim.org

25. Schoolcraft W. B. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage / W. B. Schoolcraft, E. Fragouli, J. Stevens // Fertil. Steril.— 2010.— Vol. 94.— P. 1700–1706.

Додаток 1

ДОГОВІР № 01
про науково-практичне співробітництво
між ТОВ «Клініка репродуктивної медицини
імені академіка В.І.Гриценка»
та КЗ «Харківський ліцей №116 Харківської міської ради»

м. Харків

"01" 09 2023р

ТОВ «Клініка репродуктивної медицини імені академіка В.І.Гриценка» (далі – Клініка), в особі виконавчого директора, Кудіної О.С., що діє на підставі Довіреності б/н від 17.02.2023 р., з одного боку, та КЗ «Харківський ліцей №116 Харківської міської ради» Харківської області, (далі – Ліцей) в особі директора «Харківського ліцея №116 Харківської міської ради», кандидата педагогічних наук, заслуженого працівника освіти України, Бугакової О.В., що діє на підставі Статуту, з другого боку, уклали цей договір про наступне:

1. ПРЕДМЕТ ДОГОВОРУ

- 1.1. Предметом цього Договору є науково-практичне співробітництво між ТОВ «Клініка репродуктивної медицини імені академіка В.І. Гриценка» та КЗ «Харківський ліцей №116 Харківської міської ради» з метою проведення наукового дослідження «Визначення частоти хромосомних порушень ембріонів у жінок різних вікових груп за допомогою предімплантаційної генетичної діагностики».
- 1.2. Цей Договір містить основні принципи співробітництва та взаємодії Сторін.
- 1.3. Положення цього Договору не є підставою для проведення будь-яких взаєморозрахунків між Сторонами. Внаслідок діяльності Сторін за цим Договором спільна власність та/або юридична особа не утворюються.

2. ПРАВА ТА ОБОВ'ЯЗКИ СТОРІН

2.1. Сторони зобов'язуються:

- проводити регулярні зустрічі з метою формування планів дослідження, обговорення результатів проведеного дослідження;
- систематично інформувати іншу сторону про результати наукового дослідження.

2.2. Клініка зобов'язується:

- надати учениці 10-А класу КЗ «Харківський ліцей №116 Харківської міської ради», Денисенко Д.Є., можливість працювати з набутим матеріалом (статистичними даними за період 2022 -2023рр. без надання та вказівки персональних даних пацієнтів) стосовно теми наукового дослідження, з дотриманням норм чинного законодавства України та етичних норм;
- забезпечити проведення на базі Клініки спільного наукового дослідження;
- забезпечити надання консультативної допомоги для проведення спільного наукового дослідження.

2.3. Ліцей зобов'язується:

- надавати консультативну допомогу в ході виконання дослідження;
- систематизувати та аналізувати отриману в результаті проведення дослідження інформацію.

2.4. Цей Договір не накладає на Сторони будь-яких майнових та фінансових зобов'язань, а також не встановлює будь-яких обмежень їх самостійності та автономності при здійсненні ними своєї діяльності. Кожна із Сторін не несе юридичної, майнової та іншої відповідальності за результати діяльності іншої Сторони при реалізації цього Договору.

3. ПРАВА ТА ПОРЯДОК ВИКОРИСТАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ СПІЛЬНИХ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Питання використання результатів спільного наукового дослідження, отриманих при співробітництві Сторін, вирішується Сторонами за погодженням на підставі чинного законодавства.

3.2. Отримані сторонами результати спільного наукового дослідження публікуються за погодженням сторін.

3.3. Отримані в процесі спільного наукового дослідження результати не можуть передаватися третім особам без письмового погодження обох сторін цього договору.

4. ЗМІНИ, ДОПОВНЕННЯ, РОЗІРВАННЯ ТА СТРОК ДІЇ ДОГОВОРУ

4.1. Зміни та доповнення до цього договору вносяться за погодженням Сторін та оформлюються письмово як невід'ємна частина договору.

4.2. Договір може бути розірвано достроково:
– за згодою сторін;
– на підставах, встановлених чинним законодавством;

4.3. Договір набирає силу з моменту підписання його сторонами і діє до 01.06.2024

5. ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ СТОРІН

5.1. У разі невиконання або неналежного виконання умов даного Договору Сторони несуть відповідальність згідно норм чинного законодавства України.

5.2. Відповідальними особами за виконання Договору призначаються:
– від Клініки - виконавчий директор Кудіна О.С.
– від Ліцею - директор Бугакова О.В.

6. ІНШІ УМОВИ

6.1. Всі суперечні питання, які виникли в результаті реалізації умов даного Договору, вирішуються шляхом двосторонніх переговорів, а у разі неможливості прийти до згоди, вирішуються в порядку, що передбачений чинним законодавством України.

6.2. Цей договір складено в двох примірниках, що мають однакову юридичну силу: один – примірник Клініки, один – примірник Ліцею.

7. АДРЕСИ ТА ПІДПИСИ СТОРІН

ТОВ «Клініка репродуктивної медицини імені академіка В.І.Грищенка»

61052, Харківська область, м. Харків,
вулиця Благовіщенська, 25
код ЄДРПОУ 37576708

Виконавчий директор О.С. Кудіна



КЗ «Харківський ліцей № 116» Харківської міської ради Харківської області»

61058, Харківська область, м. Харків,
вулиця Культури, 22
код ЄДРПОУ 24333964

Директор О.В. Бугакова



Додаток 2

Пояснювальна записка щодо умов передачі даних
від ТОВ «Клініка репродуктивної медицини імені академіка В.І. Грищенка»
до учениці 10-А класу КЗ «Харківський ліцей № 116 Харківської міської ради
Харківської області» Денисенко Д.Є.

Учениця 10-А класу КЗ «Харківський ліцей № 116 Харківської міської ради Харківської області» Денисенко Д.Є. з метою отримання інформації для написання наукової роботи за темою «Визначення частоти хромосомних порушень ембріонів у жінок різних вікових груп за допомогою предімплантаційної генетичної діагностики» звернулась до ТОВ «Клініка репродуктивної медицини імені академіка В.І. Грищенка».

На підставі відповідного договору був організований процес науково-практичного співробітництва між Клінікою репродуктивної медицини та Харківським ліцеєм № 116, в процесі якого учениця Денисенко Д.Є. відвідувала ембріологічну та генетичну лабораторії Клініки, де мала можливість за наданими методичними відеоматеріалами ознайомлюватись з процедурами ЕКЗ (екстракорпорального запліднення), процедурами ІКСІ (інтрацитоплазматичне введення сперматозоїда) та біопсією трофктодерми. Вона отримувала фахові консультації ембріологів та генетиків Клініки.

Відвідання вищезазначених лабораторій, яке було організоване для учениці Денисенко Д.Є., проводилось співробітниками Клініки після проведення планових маніпуляцій (тобто в неробочий час) та на умовах дотримання всіх санітарних норм.

Клініка не має права розголошувати персональні дані пацієнтів, тому учениці Денисенко Д.Є. доступ до бази персональних даних пацієнтів не надавався. Персональні дані будь-яких осіб, а також інша інформація, яка містить ознаки лікарської таємниці, їй не повідомлялися.

Денисенко Д.Є. для використання в науковій роботі отримала від Клініки інформацію виключно статистичного характеру про результати ППТ за період 2022 -2023 рр.

Виконавчий директор
Клініки репродуктивної медицини
імені академіка В.І.Грищенка



О.С. Кудіна