

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.1:611.013:618.177-089.888.11

ПРОГРЕСС ГЕНЕТИКИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА
И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ РЕПРОДУКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

© 2019 г. В. С. Баранов^{1, 2, *}, И. Ю. Коган¹, Т. В. Кузнецова¹

¹Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, 199034 Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: baranov@vb2475.spb.edu

Поступила в редакцию 29.04.2019 г.

После доработки 17.05.2019 г.

Принята к публикации 21.05.2019 г.

Наряду с большой социальной значимостью, решение проблемы “пробирочных детей” сделало возможным прямые исследования зародышей человека доимплантационных стадий. Совершенствование технологий работы с гаметами и ранними зародышами, высокая разрешающая способность современных цитогенетических и молекулярно-генетических методов не только позволили создать эффективные алгоритмы вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), но и получить важную информацию о фундаментальных процессах эмбриогенеза и генетики развития человека, ранее недоступных прямому исследованию. В частности, оценить вклад хромосомных аномалий и роль хромосомного импринтинга в патологию эмбрионального развития человека, изучить цитогенетические и молекулярные механизмы первичной эмбриональной дифференцировки, проанализировать эпигенетические изменения генома от оплодотворения до формирования бластоциты, идентифицировать гены, ответственные за первые морфогенетические преобразования дробящегося зародыша. Безусловным успехом эмбриологии человека и ВРТ явилось создание трехродительских эмбрионов как метода профилактики митохондриальных болезней, разработка универсального метода диагностики хромосомных и генных болезней. Новую эру в эмбриологии человека и ВРТ открыли исследования по геному редактированию. Подчеркивается необходимость соблюдения большой осторожности при внедрении в практику новых ВРТ, их тщательной проверки на лабораторных моделях. Прежде всего это относится к работам по редактированию генома, получению искусственных гамет, а также к созданию животных-химер с целью выращивания донорских органов и др. Отмечается серьезное отставание отечественной науки в экспериментальной эмбриологии человека, необходимость ее всемерной поддержки как со стороны фундаментальной науки, так и клинической медицины.

Ключевые слова: эмбриология человека, генетика развития, ВРТ, хромосомные аномалии, первичная эмбриональная дифференцировка, редактирование генома.

DOI: 10.1134/S0016675819100023

В 1978 г. в мире произошло знаменательное событие: усилиями двух ученых Великобритании, эмбриолога Р. Эдвардса и врача акушера-гинеколога М.Е. Стептоу, на свет появился первый ребенок, зачатый в пробирке, – Луиза Браун. В 2018 г. ей исполнилось 40 лет. Конечно, этому событию, отмеченному в 2010 г. Нобелевской премией, предшествовала долгая кропотливая работа многочисленных ученых Великобритании – специалистов по экспериментальной эмбриологии и ЭКО. Особенно большую роль в этом сыграли исследования в лаборатории эмбриологии проф. Анны МакЛарен в Лондоне. Возможность лечить различные формы бесплодия и вести скрининг зародышей до имплантации на наличие хромо-

сомных аномалий привлекло к работам по ЭКО массу последователей во всем мире, в том числе и в России. Первый “пробирочный” ребенок России появился в Центре охраны здоровья матери и ребенка в Москве в 1986 г. [1], второй – в Ленинграде, в НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта в 1987 г. [2]. Согласно обобщенным данным, с помощью различных вариантов ЭКО за 2004–2013 гг. в мире родилось почти 1.5 млн детей [3]. Большая социальная значимость ЭКО как наиболее эффективного метода лечения бесплодия на фоне падения рождаемости в России в последние годы, безусловно, создала благоприятные условия для увеличения числа центров ВРТ [4].

Доля детей “из пробирки” среди всех новорожденных в РФ за 2015–2016 гг. достигла 1,5% [4].

Качество работы центров ВРТ улучшается не только за счет более эффективных методов гормональной стимуляции яичников и повышения точности микрохирургических операций на ранних эмбрионах и гаметах, но и за счет более совершенных методов лабораторной диагностики хромосомных и генных болезней [5–9]. Естественно, что разработке и внедрению этих методов немало способствовали предварительные эксперименты на лабораторных млекопитающих, а также на эмбрионах человека, которые по разным причинам не были использованы для трансплантации в матку. Как правило, это патологические эмбрионы с признаками фрагментации, эмбрионы с тремя пронуклеусами, реже – “лишние”, фенотипически нормальные эмбрионы. Широкое внедрение в центрах ВРТ методов криоконсервации, особенно метода витрификации (технология быстрого замораживания, предотвращающая образование кристаллов льда в клетках), позволяет в настоящее время сохранять полученные эмбрионы неопределенно долго и пересаживать их в матку в последующих циклах. Эмбрионы, не использованные для трансплантации, представляют большую ценность для экспериментальных исследований, так как позволяют получить новую информацию о доимплантационных стадиях развития человека.

В обзоре суммированы новые данные по актуальным проблемам биологии развития человека, решение которых оказалось возможным благодаря внедрению новых технологий и методов молекулярной генетики. Наиболее существенные достижения в этой области включают:

- оценку вклада хромосомных аномалий и геномного импринтинга в патологию ранних стадий эмбриогенеза;

- выяснение молекулярно-генетических механизмов первичной эмбриональной индукции и 1-й фазы гаструляции;

- особенности структурно-функциональной организации хромосом и эпигенетические изменения генома человека до имплантации;

- получение трехродительских эмбрионов и первые попытки редактирования генома на ранних стадиях эмбрионального развития.

ХРОМОСОМНЫЕ НАРУШЕНИЯ

Задолго до появления методов ЭКО и ВРТ цитогенетические исследования, выполненные на материале спонтанных abortusov, показали большой вклад хромосомных нарушений в патологию эмбрионального развития человека. Согласно обобщенным данным, полученным с помощью кариотипирования и флуоресцентной ги-

бридизации *in situ* (FISH), частота хромосомных аномалий у внутриутробно погибших плодов до 9–10 нед. составляет более 50% (см. [10, 11]). Существенных отличий по частоте анеуплоидии у abortusov в сопоставимые сроки беременности, наступившей естественным путем или после применения ВРТ, не выявлено [12–14].

У эмбрионов, полученных в программах ЭКО, методом FISH с ДНК-зондами на 9–12 хромосом, включая половые Х и Y, было установлено, что хромосомные нарушения встречаются почти у 70% дробящихся эмбрионов человека 3-го дня развития [15, 16]. Высокая частота хромосомных аномалий у 5–7-дневных эмбрионов показана также с помощью методов микроматричной геномной гибридизации (aCGG) и секвенирования следующего поколения (NGS-next generation sequencing) [15]. Многочисленные исследования позволили высказать, а в дальнейшем и подтвердить предположение о том, что у человека анеуплоидия у доимплантационных зародышей представляет собой нормальное явление [9, 18]. Для сравнения напомним, что частота спонтанной анеуплоидии на ранних стадиях эмбриогенеза у лабораторных грызунов (мышей) не превышает 7–10% [19].

Типичными нарушениями кариотипа у эмбрионов являются трисомии, при этом, однако, спектр трисомий по различным хромосомам на доимплантационных стадиях развития гораздо шире и разнообразней, чем на постимплантационных [10, 11, 20]. Для ранних эмбрионов характерны также двойные и множественные трисомии по разным хромосомам и даже моносомии аутосом, которые за малым исключением после имплантации вообще не встречаются [11, 20].

Частота многих трисомий у дробящихся эмбрионов человека увеличивается с возрастом матери и обусловлена в основном ошибками сегрегации хромосом в 1-м делении мейоза в оогенезе [9, 20]. Известно, что полная форма анеуплоидии мейотического происхождения по многим хромосомам ведет к задержке формирования бластоциты, к нарушениям имплантации, к гибели эмбриона или рождению ребенка с хромосомной болезнью [16, 20]. Вместе с тем с помощью методов aCGG и NGS установлено, что более 25% случаев анеуплоидии возникает после оплодотворения, в результате аномальной сегрегации хромосом в делениях дробления [17]. Эти митотические ошибки могут происходить при дроблении зигот как с исходно нормальным, так и с аномальным наборами хромосом и не зависят от возраста матери. Они могут затрагивать одну или одновременно несколько хромосом как материнского, так и отцовского происхождения, в одном или нескольких бластомерах, происходить одновременно или последовательно в разных делениях дробления. По сочетанию кариологически различаю-

шихся бластомеров выделяют четыре основные группы мозаичных эмбрионов: анеуплоидные мозаики (нет ни одной эуплоидной клетки), анеуплоидные/эуплоидные (сочетание анеуплоидных и эуплоидных клеток), миксоплоидные (сочетание гаплоидных, ди-, три- и тетраплоидных клеток), хаотичные (каждый бластомер имеет случайный набор хромосом) [15].

Основными механизмами возникновения анеуплоидии в мейозе и раннем эмбриогенезе человека считается отставание хроматид в анафазе и реже истинное нерасхождение хромосом [9, 17, 20, 21]. Аномальную сегрегацию хромосом объясняют отсутствием контроля клеточного цикла в первых делениях дробления, которые характеризуются резкими изменениями размеров клеток и временными параметрами клеточного цикла, особенностями состава кинетохоров, их ориентацией к полюсам деления [18, 21, 22]. Не исключается также вероятность дезорганизации веретена деления, сверхдупликации центросом и формирование трехполюсных веретен, что приводит к неравному распределению гомологичных хромосом, аномалиям ядер (множественные ядра, микрояйдра) [20, 22]. Образование микроядер, содержащих отставшие в анафазе хроматиды, рассматривают как механизм, объясняющий не только возникновение анеуплоидии в период дробления зиготы, но и "самокоррекцию" трисомии (т.е. восстановление эуплоидного хромосомного набора) (подробнее см. [21]). Причинами тетраплоидии на стадии дробления считаются эндоредупликация хромосом и нарушения кариокинеза [15, 20]. Отмечено, что молекулярные механизмы геномной нестабильности у ранних зародышей человека близки или тождественны таковым при канцерогенезе [15, 18].

Следует отметить, что помимо нарушений числа хромосом сравнительно часто (в среднем в 7.5%) у доимплантационных эмбрионов человека отмечаются сегментные анеуплоидии (т.е. дупликации/делеции участков хромосом различной протяженности и локализации). Сегментные анеуплоидии могут быть мозаичными (т.н. сегментный мозаизм) и сочетаться с мозаизмом по целым хромосомам [17, 23, 24]. Установлено, что сегментные анеуплоидии могут иметь как мейотическое, так и зиготическое происхождение и чаще затрагивают хромосомы групп A, B и C (хромосомы 1–12). Горячие точки их образования ассоциированы с известными ломкими сайтами хромосом либо специфичны для гаметогенеза и/или эмбриогенеза [23].

Общая частота мозаиков с полными и частичными формами анеуплоидии по разным хромосомам на стадии морулы варьирует в широких пределах (15–90%), а на стадии бластоциты составляет в среднем около 30% [15, 20]. В значительной ме-

ре такие вариации объясняются разной чувствительностью методов хромосомного анализа и особенностями исследуемых клеток. Так, на стадии дробления для анализа доступны не более двух бластомеров, а методом FISH можно предположить наличие мозаичизма по нескольким (от 5 до 12) хромосомам, но не определить его уровень (т.е. соотношение клеток с разным хромосомным набором). На стадии бластоциты исследуются обычно образцы ДНК из нескольких клеток трофобластодермы (ТЭ), что позволяет определить мозаичизм по всем хромосомам набора на уровне 40% (методом aCGH) и 20% (NGS) [17, 25]. Установлено, что в бластоцитах аномальные клетки распределяются случайно, как в ТЭ, так и во внеклеточном матриксе (ВКМ), но необязательно в ТЭ и ВКМ одновременно [9, 20, 26, 27]. Поэтому информация о наличии и уровне мозаичизма, определенная при анализе нескольких соседних клеток ТЭ, не может быть использована для суждения о кариотипе клеток ВКМ [26–28]. Аналогичные выводы были сделаны при исследовании образцов внеклеточной ДНК из полости бластоциты (бластоцеля), источником которой служат клетки ТЭ и ВКМ [29, 30].

Снижение частоты мозаичных эмбрионов, особенно с множественными и комплексными хромосомными аномалиями, а также снижение уровня мозаичизма к стадии бластоциты указывают на селекцию против хромосомного дисбаланса на уровне организма (остановка развития и гибель эмбриона) или отдельных клеток (снижение темпов пролиферации, апоптоз). Элиминация анеуплоидных клеток путем апоптоза, преимущественно клеток ВКМ, наглядно продемонстрирована экспериментально на эмбрионах-химерах мышей, которые были способны к дальнейшему развитию, если доля эуплоидных клеток в ВКМ составляла не менее 50% [31]. Избирательная селекция, более свойственная клеткам ВКМ, чем ТЭ, по-видимому, является основным механизмом "самокоррекции" анеуплоидии у эмбрионов человека до имплантации и причиной ограниченного плацентарного мозаичизма, регистрируемого на постимплантационных стадиях [15, 26]. Гибель анеуплоидных клеток у мозаиков может приводить к задержке формирования бластоциты [16], но их наличие в ТЭ не только не препятствует имплантации, а даже способствует инвазии трофобласта в стенку матки [9].

Несмотря на то, что хромосомный статус ТЭ признан не очень надежным для суждения о кариотипе клеток ВКМ [28], а прогноз в отношении развития остается неопределенным, эмбрионы-мозаики активно используются для трансплантации во многих центрах ВРТ. Многочисленные данные о частоте наступления и вынашивания беременности, наступившей после трансплантации мозаичных эмбрионов, весьма противоречивы, что объ-

ясняется разнообразием подходов к проведению ЭКО, методов анализа хромосом и т.д. [32]. В настоящее время международными сообществами специалистов по доимплантационной диагностике разработаны общие критерии и рекомендации по использованию мозаичных эмбрионов для переноса. Так, перенос эмбриона-мозаика допустим только в случаях отсутствия эуплоидного эмбриона, а при выборе мозаика для переноса необходимо учитывать уровень мозаицизма и влияние дисбаланса по конкретной хромосоме на жизнеспособность и внутриутробное развитие [33, 34].

Таким образом, благодаря исследованиям доимплантационных зародышей, полученных в программах ВРТ, установлен большой вклад спонтанных хромосомных аберраций в патологию эмбрионального развития человека и изучены некоторые механизмы их возникновения.

Большое значение для эмбриологии человека имеет и широкое внедрение в программы ВРТ новых современных методов молекулярно-генетического анализа, таких как метод сравнительной геномной гибридизации (CGH – Comparative Genome Hybridization) и геномного секвенирования (NGS – New Generation Sequencing). Разработана и внедряется в практику новая, почти универсальная технология пренатального генетического скрининга, ПГТ-2, основанная на использовании метода кариокартирования (karyomapping), позволяющего с высокой эффективностью выявлять и вести селекцию доимплантационных зародышей не только с численными, структурными и микрохромосомными нарушениями, но даже мутаций, приводящих к частым моногенным болезням [35, 36].

ГЕНОМНЫЙ ИМПРИНТИНГ И ПАТОЛОГИЯ ЭМБРИОГЕНЕЗА

Внедрение молекулярно-генетических методов в исследование доимплантационных зародышей способствует не только повышению эффективности ВРТ, но и существенно расширяет представления об особенностях структурно-функциональной организации генома зародыша, механизмах реализации генетической информации на разных стадиях развития человека. В частности, такие исследования сыграли важную роль в понимании механизмов геномного импринтинга (ГИ) – неслучайной, зависимой от пола экспрессии родительских генов.

В 1984 г. в классических экспериментах английского исследователя Азима Сурани (Surani) и канадского Даворы Солтер (Solter) установлено, что нормальное развитие зародыша возможно только при наличии в зиготе двух геномов – отцовского и материнского (см. [37]). При различных нарушениях оплодотворения могут возникать зародыши, геном которых представлен дву-

мя материнскими (дигиния) или двумя отцовскими (диандрия) гаплодными наборами хромосом. У человека при дигинии нарушены имплантация и формирование плаценты, а при диандрии не формируется эмбрион, но активно разрастается хорион. Причиной таких нарушений, как установлено, являются гендерные особенности ГИ, которые закладываются еще в гаметогенезе и определяют различную экспрессию отцовских и материнских генов зародыша [37]. В случае диандрии характерным является злокачественное перерождение и развитие опухоли из клеток хориона – хорионэпителиомы (полный пузирный занос). Дигиния может быть причиной ранних спонтанных абортов, а при перезревании (активации генома яйцеклетки еще до овуляции) может провоцировать развитие опухоли (тератомы) яичника [38]. В отдельных случаях полный пузирный занос развивается и при нормальном кариотипе, когда вследствие импринтинга материнских генов возникает классическое андрогенетическое состояние, приводящее к опухолеподобному разрастанию хориона, т.н. биродильский полный пузирный занос (БППЗ). Исследование эпигенетики БППЗ выявило глобальные нарушения метилирования ряда материнских импринтированных генов, расположенных в коротком плече хромосомы 11 (сегмент 11p15.5). Эпигенетические и молекулярные механизмы импринтинга этих генов подробно изучены при различных патологиях развития [39, 40].

Основные молекулярные события, связанные с импринтингом, включают процессы метилирования цитозина в 5-м положении (C5) и ковалентные модификации гистоновых белков ("гистоновый код"), которые регулируют состояние хроматина [41]. Эпигенетический профиль мужских и женских гамет формируется еще в гаметогенезе и поддерживается за счет белка цинковых пальцев 57 (Zinc finger protein 57) [42]. Ошибки импринтинга, возникающие в гаметогенезе или в зиготе, нередко являются причинами нарушения эмбрионального развития, включая задержку развития и спонтанное прерывание беременности [43]. Действительно, недавно экспериментально показано, что после удаления импринтированных генов с помощью технологии редактирования генома, андрогенетические зародыши мыши оказываются способными к развитию в течение всей беременности, а гиногенетические, т.е. содержащие два гаплоидных материнских гена, даже жизнеспособны после рождения [44].

Морфогенетические эффекты ГИ характерны не только для целого генома, но касаются отдельных хромосом и проявляются после рождения в виде различных болезней хромосомного импринтинга. Имеются данные, что современные ВРТ (гормональная стимуляция, оплодотворение и культивирование *in vitro*) могут быть причиной

нарушения профиля импринтинга у ранних зародышей, что и способствует нерасхождению хромосом [45, 46]. При этом существует вероятность возникновения ОРД (однородительской дисомии, то есть присутствие в кариотипе двух гомологичных хромосом от одного родителя при отсутствии гомолога второго родителя), которая связана с эффектом геномного импринтинга при наличии в этих хромосомах импринтированных генов [47]. Низкая частота ОРД у эмбрионов до имплантации (3% на 3-й день развития и менее 1% в клетках трофобластермы на 5-й день [15]), свидетельствует о том, что коррекция трисомии через образование ОРД – относительно редкое событие [47].

У человека предполагают наличие около 100 импринтированных генов, продукты которых вовлечены в контроль роста и пролиферацию тканей зародыша и плаценты, регуляцию клеточной дифференцировки в центральной нервной системе. Возникающие в процессе гаметогенеза ошибки метилирования генов, т.н. эпимутации, приводят к различным нарушениям функции генома, к задержке эмбрионального развития и прерыванию беременности [48]. Таким образом, экспериментальные исследования проблем биологии развития человека на зародышах, полученных в программе ВРТ, позволили получить новые данные о локализации и функциях импринтированных генов в эмбриогенезе человека.

Важная информация о начальных стадиях эмбриогенеза человека была получена в результате комплексных патоморфологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических исследований зародышей человека.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕРВИЧНОЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ИНДУКЦИИ И 1-Й ФАЗЫ ГАСТРУЛЯЦИИ

Доимплантационные стадии эмбриогенеза подробно изучены в экспериментах на многих видах животных, особенно на грызунах. К настоящему времени идентифицированы и изучены на мышах многие ключевые гены доимплантационного развития, в том числе гены, детерминирующие дифференцировку дробящегося зародыша на клетки трофобласта и ВКМ (см. [49, 50]), а также гены, поддерживающие тотипotentное (недифференцированное) состояние в клетках ранних зародышей (*OCT-4*, *NANOG*, *SOX-2*) и детерминирующие развитие первичных половых клеток (см. [50]). В какой мере эти данные отражают паттерн экспрессии генов у зародышей человека, долгое время оставалось невыясненным. Их детальный анализ стал реальным после появления новых молекулярно-генетических методов изучения генома и совпал по времени с внедрением в медицину технологии ЭКО и ВРТ.

Последние годы ознаменовались бурным ростом числа исследований, посвященных изучению экспрессии генов в эмбриогенезе человека. Несмотря на официальный запрет, существенно регламентирующий работу с доимплантационными зародышами человека [51], решением Медицинского комитета Великобритании в 2015 г. впервые были одобрены эксперименты на культивированных до стадии бластоциты эмбрионах человека с целью изучения молекулярно-генетических механизмов, регулирующих доимплантационное развитие.

С помощью метода ТаqMan у дробящихся эмбрионов человека изучена дифференциальная экспрессия 51 гена, которые регулируют движение и размножение клеток [52]. Большой прогресс в изучении генома ранних зародышей человека достигнут в последние годы благодаря внедрению метода полногеномного секвенирования. Глобальное исследование профиля экспрессии генов от зиготы до стадии бластоциты позволило идентифицировать главные ТФ (транскрипционные факторы), регулирующие первые деления дробления (*HNF1A*, *FXA2*, *EP300*), формирование морулы и бластоциты (*SOX2*, *KLF4*, *JUN*), ремоделирование хроматина (*EP300*). Исследованы экспрессионные профили одиннадцати ТФ, включающих экспрессию многих структурных генов [53]. Используя технологию редактирования генома CRISPR/Cas9, было проведено направленное выключение гена *OCT-4* и исследованы особенности развития зародышей после прекращения экспрессии этого гена [54]. Путем полногеномного секвенирования, дополненного введением иРНК, удалось проследить эпигенетическую транзицию (функциональный переход) от материнского генома оплодотворенной яйцеклетки к собственно геному самого зародыша, обусловленную динамическими структурными изменениями хроматина [55]. Принимая во внимание, что эпигенетический профиль зародышей, полученных после ВРТ, отличается от нормального и может неблагоприятно сказываться на последующем развитии, высокая научная и практическая значимость таких работ не вызывает сомнения [41].

В настоящее время подобные исследования на ранних зародышах человека активно проводятся во многих странах, особенно там, где разрабатываются и уже проходят испытания технологии редактирования генома (см. следующий раздел).

Возможности культивирования зародышей человека *in vitro* от зиготы до стадии бластоциты в программах ВРТ, а в последние годы даже до стадии первичной полоски (13 дней) позволили восстановить всю последовательность событий раннего эмбриогенеза человека и сравнить ее с таковой у других млекопитающих, прежде всего у мышей. Хронология доимплантационного разви-

тия человека и гены, контролирующие его, подробно рассмотрены нами в более ранних обзорах [49, 50]. В последние годы, как уже отмечалось, число публикаций, посвященных структурно-функциональной организации генома зародыша, эпигенетическому профилю пронуклеусов оплодотворенной яйцеклетки человека и дифференциальной экспрессии генов на доимплантационных стадиях, стремительно нарастает [55–57].

Известно, что у человека мужской и женский пронуклеусы, образующиеся уже через несколько часов после оплодотворения, практически равны по размеру, но существенно отличаются по конфигурации хроматина. Установлено, что вскоре после образования пронуклеусов в них появляются хроматиновые нити, которые образуют локальные скопления (узелки), т.н. топологически ассоциированные домены (ТАД) [58]. В мужском пронуклеусе их много, они расположены группами (компартментами) вблизи ядерной мембранны (ТАД-А). В женском их число заметно меньше, они реже объединяются в компартменты, содержат мало активных генов (ТАД-В). Биологический смысл ТАД и их функции пока неизвестны. Скорее всего они являются следствием особенностей спирализации хромосом мужского и женского пронуклеусов и в определенной мере свидетельствуют о различиях их функциональной активности. Считается, что ТАД-компартменты отражают особенности структурно-функциональной организации генома зародыша. Они определяют пространственное расположение функциональных доменов, способствуют сближению энхансерных и промоторных последовательностей ДНК структурных генов, формируют программу начальных этапов работы генома [59]. Уместно отметить, что изучение ТАД в норме и патологии сегодня рассматривается как новое направление цитогенетики, получившей название цитогеномики [60]. Возможность изучать паттерны ТАД и динамику экспрессии их генов уже на самых ранних стадиях эмбриогенеза открывает большие перспективы для понимания этиологии и патогенеза хромосомных болезней, поисков путей их профилактики и лечения.

Морфологические исследования пронуклеусов оплодотворенных яйцеклеток человека хорошо согласуются с особенностями морфологии хромосом в метафазе 1-го деления дробления. Хромосомы из мужского пронуклеуса мало спирализованы, нитевидные и резко отличаются от коротких, сильно спирализованных “материнских” хромосом. Таким образом, гетероцикличность хромосом зародышей 1-го деления дробления, ранее отмеченная на мышах [19], справедлива и для человека и скорее всего свидетельствует о более ранней функциональной активности генов отцовского генома. Действительно, преждевременная активация сотен генов отцовского генома на стадии зи-

готы показана методом полногеномного секвенирования [61].

Установлено также, что при дроблении зиготы происходит активация гетерохроматина, которая сопровождается экспрессией находящихся в нем транспозонов. Предполагают, что экспрессия транспозонов, особенно ретротранспозона LINE1, необходима для инициации работы генома после оплодотворения, а реструктурирование хроматина в пронуклеусах – для активации процессов транскрипции [62]. В процессе ремоделирования хроматина и деления бластомеров нередко происходят повреждения хромосом, которые reparируются с помощью специальной ферментной системы. Важно подчеркнуть, что дефекты восстановления целостности ДНК и нарушения эпигенетического репрограммирования генома вызывают остановку развития [63].

Другие эпигенетические изменения генома пронуклеусов касаются процессов тотального деметилирования–реметилирования ДНК, которые соответствуют процессам репрограммирования генома и включению индивидуальной программы развития. Кинетика эпигенетических изменений на доимплантационных стадиях развития человека уже хорошо изучена. При помощи бисульфитного секвенирования и иммунофлуоресцентного окрашивания подробно проанализированы эпигенетические изменения, связанные с метилированием и гидроксиметилированием ДНК, изменениями гистонов и пространственной организацией хроматина [64–67].

На зародышах человека, полученных в программах ВРТ, изучена динамика метилирования–деметилирования ДНК зародыша от зиготы до стадии бластоциты. В серии исследований с использованием специфических антител к метилцитозину (5mC) и гидроксиметилцитозину (5hmC) показаны различия между отцовским и материнским пронуклеусами и гомологичными хромосомами в метафазе 1-го деления дробления [50, 68–70]. На стадии метафазы 2-го деления дробления для хромосом характерно асимметричное распределение 5mC и 5hmC в сестринских хроматидах, которое становилось менее выраженным за счет постепенного снижения уровня 5mC с каждым делением дробления. С 8-клеточной стадии до стадии бластоциты хромосомы постепенно приобретают сегментспецифичный рисунок дифференциальной исчерченности [50, 68–70]. Выявлены различия, особенно заметные на 3–4-е дни развития, в уровне (гидрокси)метилирования между эмбрионами “низкого” и “хорошего” качества [67].

В последние годы исследования генетического репрограммирования сосредоточены на изучении единичных клеток и выяснению роли индивидуальных генов, контролирующих этот процесс [52,

63]. Согласно современным представлениям, первые изменения, связанные с первичной дифференцировкой, т.е. с развитием ВКМ и трофэктордермы (ТЭ), происходят уже на стадии четырех бластомеров. Ключевую роль в этом играет транскрипционный фактор (ТФ) SOX2, продукт которого связывается с ДНК бластомеров [71]. В зависимости от наличия или отсутствия аминокислоты аргинина в гистоне 3 (H3R26) прочность и продолжительность такого связывания варьируют. При длительном контакте клетки начинают экспрессировать фактор транскрипции SOX21, который подавляет дифференцировку бластомера. Такие клетки в дальнейшем становятся клетками ВКМ и формируют все ткани эмбриона. Клетки с коротким временем транзиторного контакта ДНК с ТФ SOX2 вступают в дифференцировку и превращаются в клетки ТЭ. Фермент CARM1, ответственный за метилирование гистона H3, включает процесс первичной дифференцировки. Факторы индукции синтеза этого ключевого фермента неизвестны. Предполагается, что таковым может быть продукт гена *DUX4*, который начинает экспрессироваться еще в зиготе и, как показали опыты с его направленным выключением, активирует работу генома зародыша [72]. Удивительно, что ген *DUX4* ранее уже был идентифицирован как главный ген, мутации которого приводят к тяжелому нервно-мышечному заболеванию – лицеолапаточно-плечевой мышечной дистрофии [73]. Во истину “пути Господни неисповедимы”: фенотипической гетерогенности экспрессии одного и того же гена в онтогенезе можно только удивляться.

Таким образом, в экспериментах непосредственно на зародышах человека с помощью программы ВРТ получена важная новая информация о ключевых морфогенетических процессах, которые реализуются на доимплантационных стадиях развития, идентифицированы некоторые механизмы их регуляции и начаты масштабные исследования экспрессии генов на начальных этапах онтогенеза человека.

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ РАБОТЫ С ЗАРОДЫШАМИ ЧЕЛОВЕКА РАННИХ СТАДИЙ

Длительное культивирование

В программах ВРТ зародыш обычно развивается *in vitro* 3–5 дней, после чего его либо пересаживают в матку или замораживают до -175°C . В 2016 г. появились сообщения и комментарии об успешном культивировании *in vitro* зародыша человека до 14-го дня развития, т.е. до стадии первичной полоски и начала первых сердцебиений [63]. Длительный срок культивирования *in vitro* потребовал разработки специальных питатель-

ных сред и особых условий культивирования. Созданная модель позволила детально проследить *in vitro* развитие человека в течение первых 13 дней и получить принципиально новые данные. Было установлено, что зародыш человека начиная со стадии зиготы представляет собой автономную развивающуюся систему, способную уже на стадии бластоциты к самоорганизации и формированию главной осевой структуры тела (первичной полоски) и провизорных органов. Получены прямые ответы на классические вопросы эмбриологии человека, касающиеся механизмов формирования желточного мешка и амниона [74, 75]. Установлено, что первый образуется за счет разрастания внезародышевой энтодермы, а второй формируется поларизованными клетками эпiblasta [76].

В ходе оживленной дискуссии многие ведущие ученые, вопреки существующим запретам, поддержали эти исследования. Основным аргументом было признание того очевидного факта, что культивируемые *in vitro* зародыши человека ранних стадий являются уникальной моделью для изучения патогенеза многих тяжелых нейропсихических заболеваний (аутизма, шизофрении), механизмов повреждающего действия химических и инфекционных (например, вируса Жика) тератогенов, первичного патологического звена всех генных и хромосомных заболеваний и врожденных аномалий развития. Кроме того, они представляют большой интерес для изучения процессов имплантации, нарушение которой сопряжено с развитием такой частой и нередко смертельной для плода и даже матери патологии, как преэклампсия. В ходе дискуссии была отмечена необходимость получения официального разрешения на культивирование доимплантационных зародышей человека *in vitro* вплоть до 14-го дня и возможность их использования для научных исследований [76]. Существующие отечественные постановления, регламентирующие работу с ранними зародышами человека в центрах ВРТ РФ, также требуют пересмотра (см. ниже).

Геномная и генная терапия

Эксперименты на дробящихся зародышах человека в последние годы приобретают все более широкий характер в связи с активной разработкой методов редактирования генома человека и коррекцией генов с целью лечения наследственных болезней.

Геномное редактирование – трехродительские зародыши. С целью преодоления некоторых форм бесплодия, связанных с функциональной неполнотой яйцеклеток, и для лечения митохондриальных болезней в феврале 2015 г. в Великобритании была официально одобрена технология “трехродительских” эмбрионов. Для их получения ядро яйцеклетки, дефектной по качеству митохон-

дрий, пересаживают в предварительно энуклеированную донорскую яйцеклетку, полученную от здоровой женщины. После оплодотворения такой “гибридной” яйцеклетки возникает зародыш с нормальным митохондриальным геномом донорской яйцеклетки и с ядром зиготы (двумя пронуклеусами) от супругов. Летом 2016 г. появилось сообщение о рождении такого трехродительского ребенка в Мексике [77]. Операция была проведена американскими специалистами, поскольку в США эта технология была тогда запрещена. После трансплантации ядра 80% прооперированных зигот содержали менее 2% патологических митохондрий. В настоящее время в разных странах зарегистрированы десятки случаев рождения “3-родительских” детей. Однако не всегда развитие таких “комбинированных” зародышей происходит normally, что, как полагают, обусловлено репликативными особенностями митохондриальных геномов и нарушениями взаимодействия их белков с продуктами ядерного генома реципиента. Проблема ядерно-митохондриальных взаимодействий у 3-родительских зародышей активно изучается.

Решение этой проблемы в настоящее время существенно осложняется тем, что согласно последним данным, полученным на мышах и уже подтвержденных на человеке [78], при оплодотворении зародыш получает митохондрии не только из яйцеклетки, но и из сперматозоида. Какова дальнейшая судьба “отцовских” митохондрий в организме зародыша? Влияют ли они на процессы онтогенеза? Следует ли их учитывать в популяционных и филогенетических исследованиях, в тестах по геномной дактилоскопии, основанных на анализе митохондриального генома, остается пока неизвестным.

Первый опыт по редактированию генов зародышей человека. После ПЦР, открытой еще в 1986 г., ни один метод не вызвал такой сенсации и не приводил к таким оживленным дискуссиям, как технология редактирования генома с помощью генно-инженерной системы CRISPR/Cas9 (английская аббревиатура означает Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats – кластеры регуляторных чередующихся коротких палиндромов и бактериального фермента Cas9). На клеточных культурах этот подход уже был с успехом апробирован в экспериментах по коррекции мутаций, вызывающих тяжелые наследственные болезни (муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна, дегенерация сетчатки глаза), для лечения инфекционных заболеваний (ВИЧ) и в исследованиях тонкой структурно-функциональной организации генома человека. Недавно с помощью этой технологии проводились эксперименты на мышах, а затем на зиготах человека с целью коррекции мутаций в гене β-глобина, вызывающих тяжелое, распространенное заболевание – β-та-

лассемию [79]. Первые опыты и серия последующих работ показали, что коррекция мутации β-глобинного гена происходит только в 5–15% клеток, но при этом возникают дополнительные мутации в других участках ДНК, следствием которых могут быть нарушения других генов. Высказано мнение о необходимости разработки Международного моратория, ограничивающего проведение подобных исследований на ранних зародышах и половых клетках человека [80].

На фоне этих достаточно скромных результатов сенсационноозвучала работа группы американских авторов под руководством нашего бывшего соотечественника Шукрата Миталипова (Shukrata Mitalipov) из Орегонского Университета (США), в которой сообщалось об удачной коррекции на стадии зиготы доминантной мутации гена *MYBPC3*, ответственной за развитие тяжелого наследственного заболевания – гипертрофической кардиомиопатии [81]. В этой работе сперматозоид от больного отца вместе с соответствующей CRISPR/Cas9-конструкцией (направляющая РНК и корректирующая кДНК последовательности) вводили в яйцеклетку от здоровой женщины. Успешная коррекция мутации отмечена в 70% случаев. Эти сенсационные результаты были поставлены под сомнение исследователями многих лабораторий, которые установили, что “исправление” мутации в действительности произошло не за счет нормальной введенной кДНК, а вследствие гомологичной рекомбинации между мутантным и диким (“нормальным”) аллелями гена *MYBPC3*, т.е. вставки в отцовский геном нормальной материнской копии гена. Таким образом ген из материнского пронуклеуса мог заменить мутантный отцовский, остается в области догадок и спекуляций. По мнению многих специалистов, эти результаты весьма сомнительны и требуют дополнительного подтверждения и серьезной проверки.

К 2018 г. выполнено пять работ на доимплантационных зародышах человека уже с целью коррекции мутаций и создания устойчивости к ВИЧ-инфекции (направленная мутация (делеция) в гене *CCR5*).

Отдельного упоминания заслуживает работа, выполняемая в Институте им. Фрэнсиса Крика в Лондоне, в которой предложено использовать технологии CRISPR/Cas9 для изучения молекулярных механизмов раннего развития человека. Британская комиссия по оплодотворению и эмбриологии человека (Human fertilization and Embryology Authority) официально разрешила такие исследования. Их цель – выяснить, мутации каких генов связаны с неразвивающейся беременностью, как повысить эффективность методов ВРТ для лечения бесплодия [54].

Эксперименты по редактированию геномов вызывают большую настороженность не только у широкой общественности, но и у специалистов. Участники дискуссии сошлись во мнении, что сегодня зародыши с измененными генами нельзя использовать для трансплантации в матку. Технология редактирования генома ранних зародышей человека не может быть внедрена до тех пор, пока не будет доказана ее полезность и безопасность, по крайней мере, в нескольких поколениях. В настоящее время эта технология запрещена в 40 странах. В 15 странах запрещены эксперименты по редактированию генома гамет [80].

В связи с этим опасной сенсацией в конце 2018 г. прозвучало сообщение о рождении в Китае девочек-близнецов, у которых методом редактирования генома на стадии зиготы в гене *CCR5* была вызвана направленная мутация (делеция протяженностью 32 нуклеотида), определяющая устойчивость организма к ВИЧ-инфекции. Молекулярно-генетическая операция была выполнена без официального разрешения или согласия местного этического комитета. В качестве морального оправдания этой сенсации упоминают о том, что в условиях инкогнито была также в 1978 г. проведена первая успешная трансплантация зародыша, зачатого в пробирке (см. выше). Принципиальное отличие, однако, в том, что в работе английских авторов риск эксперимента ограничивался одним человеком или одной семьей, тогда как отдаленные последствия редактирования генома родившихся девочек-близнецов не предсказуемы и могут иметь тяжелые последствия как для самих детей, так и для их потомства. Тем не менее джинн уже выпущен из бутылки, и при отсутствии строгих регламентаций подобных экспериментов на человеке и их тщательного контроля со стороны этических комитетов и надзорных органов он может представить реальную опасность для будущего человечества. В этой связи в 2019 г. по инициативе ведущих американских специалистов по редактированию генома человека был предложен глобальный мораторий, запрещающий клиническое использование всех видов генетического редактирования генома гамет человека с целью получения генномодифицированного потомства [82].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкое внедрение вспомогательных репродуктивных технологий, разрабатываемых для борьбы с бесплодием, сделало возможным проведение прямых научных исследований на зародышах человека с использованием новых молекулярно-генетических методов. Итогом таких исследований стали принципиально новые данные по генетике ранних стадий эмбриогенеза человека, о причинах основных нарушений доминантенного развития, возможностях редактирования генома и др.

На фоне этих несомненных достижений уместно обратить внимание на то, что исследования по экспериментальной эмбриологии человека сегодня очень активно проводятся во многих зарубежных странах, но по разным причинам они малодоступны и единичны в России. Связано это не только с законодательными актами, существенно лимитирующими подобные исследования в нашей стране, но и с отсутствием материально-технической базы для работ по экспериментальной эмбриологии. Дело в том, что всем новациям и прорывам в области ВРТ обычно предшествуют серьезные экспериментальные исследования на зародышах лабораторных млекопитающих. К большому сожалению, сегодня *отставание отечественной науки в области экспериментальной эмбриологии еще более катастрофично, чем в молекулярной генетике*. В 80-х годах прошлого века культивирование зародышей лабораторных млекопитающих (мыши), техника микрохирургических операций и исследования по экспериментальной эмбриологии млекопитающих активно развивались в ряде институтов АН Москвы, Ленинграда, Новосибирска и других городов РФ. Особенno существенные результаты в изучении раннего эмбриогенеза и генетических механизмов нормального и патологического развития млекопитающих были получены под руководством проф. А.П. Дыбана в Отделе эмбриологии НИИ экспериментальной медицины (Санкт-Петербург). Многие сотрудники этого отдела после его расформирования в 1995 г. перешли на работу в различные частные центры ЭКО/ВРТ Санкт-Петербурга, Москвы, Минска, Киева и других городов.

В настоящее время дефицит кадров в области экспериментальной эмбриологии млекопитающих и человека очевиден. Назрела настоятельная необходимость в подготовке кадров и создании условий для проведения углубленных исследований по экспериментальной эмбриологии как на лабораторных моделях, так и непосредственно на человеке. Нет сомнения, что такие исследования с использованием передовых молекулярно-генетических технологий, методов биоинформатики и системной генетики позволят достичь существенного прогресса в понимании механизмов реализации генетической информации в онтогенезе, будут способствовать решению многих важных медицинских и социальных задач, связанных с проблемами бесплодия, падения рождаемости, ранней диагностикой и профилактикой наследственных и врожденных заболеваний. В эпоху внедрения передовых технологий с целью редактирования генома и генной терапии, достижений молекулярной медицины в изучении патогеномики и цитогеномики наследственных болезней интенсификация исследований и качественный прорыв отечественной науки в экспериментальной эмбриологии и генетике эмбрионального

развития человека представляются особенно актуальными.

Работа выполнена в рамках Фундаментальной научно-исследовательской темы министерства науки и высшего образования РФ на 2019–2021 гг. (рег. номер АААА-А19-119021290033-1).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лукин В.А., Леонов Б.В., Калинина Е.А. и др. Успешное завершение беременности, наступившей после оплодотворения яйцеклеток *in vitro* и переноса эмбрионов в полость матки женщины // Акушерство и гинекология. 1988. Т. 64. № 4. С. 38–41.
2. Никитин А.И., Китаев Э.М., Савицкий Г.А. и др. Экстракорпоральное оплодотворение у человека с последующей успешной трансплантацией эмбриона и рождением ребенка // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1987. Т. 9. № 10. С. 39–43.
3. Kushnir V.A., Barad D.H., Albertini D.F. et al. Systematic review of worldwide trends in assisted re-productive technology 2004–2013 // Reprod. Biol. Endocrinol. 2017. V. 15(1). P. 6. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0225-2>
4. Регистр ВРТ. Отчет за 2016 год: сайт Российской ассоциации репродукции человека [Электронный ресурс] URL: http://rafr.ru/d_registr_otchet/Regis-trART2016.pdf (дата обращения 22.04.2019).
5. Imdia A.N., Plosker S. The past, present, and future of preimplantation genetic testing // Clin. Lab. Med. 2016. V. 36(2). P. 385–399. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2016.01.012>
6. SenGupta S.B., Dhanjal S., Harper J.C. Quality control standards in PGD and PGS // Reprod. Biomed. Online. 2016. V. 32(3). P. 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.11.020>
7. Sermon K. Novel technologies emerging for preimplantation genetic diagnosis and preimplantation genetic testing for aneuploidy // Expert. Rev. Mol. Diagn. 2017. V. 17(1). P. 71–82. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1262261>
8. Handyside A.H., Harton G.L., Mariani B. et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes // J. Med. Genet. 2010. V. 47(10). P. 651–658. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.069971>
9. Griffin D.K., Ogur C. Chromosomal analysis in IVF: just how useful is it? // Reproduction. 2018. V. 156(1). F29–F50. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0683>
10. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека. Научно-практические аспекты. СПб: Изд-во Н-Л, 2007. 640 с.
11. Лебедев И.Н. Цитогенетика эмбрионального развития человека: исторические аспекты и современные концепции // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Новосибирск: Альфа-Виста Н, 2008. Вып. 12. С. 127–140.
12. Чиряева О.Г., Пендина А.А., Тихонов А.В. и др. Сравнительный анализ аномалий кариотипа при неразвивающейся беременности, наступившей естественным путем и с применением вспомогательных репродуктивных технологий // Журн. акушерства и женских болезней. 2012 Т. 61. № 3. С. 132–140. <https://doi.org/10.1159/000446099>
13. Pendina A.A., Efimova O.A., Chiryaeva O.G. et al. A comparative cytogenetic study of miscarriages after IVF and natural conception in women aged under and over 35 years // J. Assist. Reprod. Genet. 2014. V. 31(2). P. 149–155. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0148-1>
14. Wu T., Yin B., Zhu Y. et al. Molecular cytogenetic analysis of early spontaneous abortions conceived from varying assisted reproductive technology procedures // Mol. Cytogenet. 2016. V. 9. P. 79. <https://doi.org/10.1186/s13039-016-0284-2>
15. McCoy R.C. Mosaicism in preimplantation human embryos: When chromosomal abnormalities are the norm // Trends in Genet. 2017. V. 33(7). P. 448–463. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.04.001>
16. Su Y., Li J.J., Wang C. et al. Aneuploidy analysis in day 7 human blastocysts produced by *in vitro* fertilization // Reprod. Biol. Endocrinol. 2016. V. 14(20). P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0157-x>
17. Munné S., Blazek J., Large M. et al. Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing // Fertil. Steril. 2017. V. 108(1). P. 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.05.002>
18. Lee A., Kiessling A.A. Early human embryos are naturally aneuploid – can that be corrected? // J. Assist. Reprod. Genet. 2017. V. 34(1). P. 15–21. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0845-7>
19. Dyban A.P., Baranov V.S. Cytogenetics of Mammalian Embryonic Development. Oxford: Clarendon Press, 1987. 362 p.
20. Taylor T.H., Gitlin S.A., Patrick J.L. et al. The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans // Hum. Reprod. Update. 2014. V. 20(4). P. 571–581. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu016>
21. Vázquez-Diez C., FitzHarris G. Causes and consequences of chromosome segregation error in preimplantation embryos // Reproduction. 2018. V. 155(1). P. R63–R76. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0569>
22. van de Werken C., Avo Santos M., Laven J.S. et al. Chromosome segregation regulation in human zygotes: altered mitotic histone phosphorylation dynamics underlying centromeric targeting of the chromosomal passenger complex // Hum. Reprod. 2015. V. 30(10). P. 2275–2291. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev186>
23. Babariya D., Fragouli E., Alfarawati S. et al. The incidence and origin of segmental aneuploidy in human

- oocytes and preimplantation embryos // *Hum. Reprod.* 2017. V. 32(12). P. 2549–2560.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dex324>
24. Treff N.R., Franasiak J.M. Detection of segmental aneuploidy and mosaicism in the human preimplantation embryo: technical considerations and limitations // *Fertil. Steril.* 2017. V. 107(1). P. 27–31.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.039>
25. Sachdev N.M., Maxwell S.M., Besser A.G., Grifo J.A. Diagnosis and clinical management of embryonic mosaicism // *Fertil. Steril.* 2017. V. 107(1). P. 6–11.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.10.006>
26. Gleicher N., Orvieto R. Is the hypothesis of preimplantation genetic screening (PGS) still supportable? A review // *J. Ovarian Res.* 2017. V. 10(1). P. 21.
<https://doi.org/10.1186/s13048-017-0318-3>
27. Victor A.R., Griffin D.K., Brake A.J. et al. Assessment of aneuploidy concordance between clinical trophectoderm biopsy and blastocyst // *Hum. Reprod.* 2019. V. 34(1). P. 181–192.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dey327>
28. Esfandiari N., Bunnell M.E., Casper R.F. Human embryo mosaicism: did we drop the ball on chromosomal testing? // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016. 33(11). P. 1439–1444.
29. Скрябин Н.А., Лебедев И.Н., Артюхова В.Г. и др. Молекулярное кардиотипирование по внеклеточной ДНК бластоцеля как основа неинвазивного преимплантационного генетического скрининга анеуплоидий // Генетика. 2015. Т. 51. № 11. С. 1301–1307.
30. Tsvikko O., Zhigalina D.I., Jatsenko T. et al. Karyotype of the blastocoel fluid demonstrates low concordance with both trophectoderm and inner cell mass // *Fertil. Steril.* 2018. V. 109(6). P. 1127–1134.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.02.008>
31. Bolton H., Graham S.J.L., van der Aa N. et al. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11165.
<https://doi.org/10.1038/ncomms11165>
32. Kushnir V.A., Darmon S.K., Barad D.H., Gleicher N. Degree of mosaicism in trophectoderm does not predict pregnancy potential: A corrected analysis of pregnancy outcomes following transfer of mosaic embryos // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2018. V. 16(1). P. 6.
<https://doi.org/10.1186/s12958-018-0322-5>
33. PGDIS Newsletter, July 19, 2016 PGDIS – Position Statement on Chromosome Mosaicism and Preimplantation Aneuploidy Testing at the Blastocyst Stage. http://www.pgdis.org/docs/newsletter_071816.html.
34. COGEN Position Statement on Chromosomal Mosaicism Detected in Preimplantation Blastocyst Biopsies. <https://ivf-worldwide.com/cogen/general/cogen-statement.html>.
35. Handyside A.H. Live births following karyomapping – a “key” milestone in the development of preimplantation genetic diagnosis // *Reprod. Biomed. Online.* 2015. V. 31(3). P. 307–308.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.07.003>
36. Natesan S.A., Handyside A.H., Thornhill A.R. et al. Live birth after PGD with confirmation by a comprehensive approach (karyomapping) for simultaneous detection of monogenic and chromosomal disorders // *Reprod. Biomed. Online.* 2014. V. 29(5). P. 600–605.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.07.007>
37. Ferguson-Smith A., Bourc'his D. The discovery and importance of genomic imprinting // *eLife.* 2018. V. 7. e2368.
<https://doi.org/10.7554/eLife.42368>
38. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Цитогенетические и эпигенетические аспекты пузырного заноса // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Новосибирск: Альфа-Виста, 2008. Вып. 12. С. 151–161.
39. Лепшин М.В., Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Множественные эпимутации импринтированных генов в геноме человека и наследственная патология // Генетика. 2014. Т. 50. № 3. С. 253–272.
40. Саженова Е.А., Никитина Т.В., Скрябин Н.А. и др. Эпигенетический статус импринтированных генов в плаценте при привычном невынашивании беременности // Генетика. 2017. Т. 53. № 3. С. 364–377.
41. Huntriss J., Balen A.H., Sinclair K.D. et al. On behalf of the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Epigenetics and Reproductive Medicine. Scientific Impact Paper No. 57 // *BJOG.* 2018. V. 125(13): e43–e54.
<https://doi.org/10.1111/1471-0528.15240>
42. Takahashi N., Coluccio A., Thorball C.W. et al. ZNF445 is a primary regulator of genomic imprinting // *Genes Dev.* 2019. V. 33(1–2). P. 49–54.
<https://doi.org/10.1101/gad.320069.118>
43. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Молекулярные механизмы нарушений импринтированных генов при патологии пре- и постнатального развития // Мед. генетика. 2018. Т. 17. № 11. С. 3–6.
<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2018.11.3-6>
44. Li Z.K., Wang L.Y., Wang L.B. et al. Generation of uniparental mice from hypomethylated haploid ESCs with imprinting region deletions // *Cell Stem Cell.* 2018. V. 23(5). P. 665–676.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.09.004>
45. Jiang Z., Wang Y., Lin J. et al. Genetic and epigenetic risks of assisted reproduction // *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2017. V. 44. P. 90–104.
<https://doi.org/10.1016/j.bpbogyn.2017.07.004>
46. Hattori H., Hiura H., Kitamura A. et al. Association of four imprinting disorders and ART // *Clin. Epigenetics.* 2019. V. 11(1). P. 21.
<https://doi.org/10.1186/s13148-019-0623-3>
47. Xu J., Zhang M., Niu W. et al. Genome-wide uniparental disomy screen in human discarded morphologically abnormal embryos // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 12302.
<https://doi.org/10.1038/srep12302>
48. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. Геномный импринтинг и вспомогательные репродуктивные технологии // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Новосибирск: Академиздат. 2018. Вып. 27. С. 105–116.
49. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Генетика развития человека // Наследственные болезни: национальное руководство / Под ред. акад. РАМН Бочкова Н.П.,

- акад. РАМН Гинтера Е.К., акад. РАМН Пузырева В.П. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. С. 81–125.
50. Баранов В.С., Кузнецова Т.В., Пендина А.А. и др. Эпигенетические механизмы нормального и патологического развития человека // Эпигенетика. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. С. 225–266.
 51. On Human Gene Editing: International Summit Statement. <https://www8.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?RecordID=12032015a>.
 52. Munch E.M., Sparks A.E., Gonzalez Bosquet J. Differentially expressed genes in preimplantation human embryos: potential candidate genes for blastocyst formation and implantation // J. Assist. Reprod. Genet. 2016. V. 33(8). P. 1017–1025. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0745-x>
 53. Godini R., Fallahi H. Dynamics changes in the transcription factors during early human embryonic development // J. Cell Physiol. 2019. V. 234(5). P. 6489–6502. <https://doi.org/10.1002/jcp.27386>
 54. Fogarty N.M.E., McCarthy A., Snijders K.E. et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis // Nature. 2017. V. 550 (7674). P. 67–73. <https://doi.org/10.1038/nature24033>
 55. Okada Y., Yamaguchi K. Epigenetic modifications and reprogramming in paternal pronucleus: sperm, preimplantation embryo, and beyond // Cell Mol. Life Sci. 2017. V. 74(11). P. 1957–1967. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2447-z>
 56. Ke Y., Xu Y., Chen X. et al. 3D chromatin structures of mature gametes and structural reprogramming during mammalian embryogenesis // Cell. 2017. V. 170(2). P. 367–381. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.029>
 57. Eckersley-Maslin M.A., Alda-Catalinas C., Reik W. Dynamics of the epigenetic landscape during the maternal-to-zygotic transition // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2018. V. 19(7). P. 436–450. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0008-z>
 58. Racko D., Benedetti F., Dorier J., Stasiak A. Are TADs supercoiled? // Nucleic Acids Res. 2019. V. 47(2). P. 521–532. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1091>
 59. Hug C.B., Vaquerizas J.M. The birth of the 3D genome during early embryonic development // Trends Genet. 2018. V. 34(12). P. 903–914. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.09.002>
 60. Лебедев И.Н. Цитогенетика человека в геномную и постгеномную эру: от архитектуры генома к новым хромосомным болезням // Цитология. 2018. Т. 60. № 7. С. 499–502. <https://doi.org/10.31116/tsitol.2018.07.02>
 61. Yamamoto R., Aoki F. A unique mechanism regulating gene expression in 1 cell embryos // J. Reprod. Dev. 2017. V. 63(1). P. 9–11. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-133>
 62. Du H., Zheng B., Huang R. et al. Allelic reprogramming of 3D chromatin architecture during early mammalian development // Nature. 2017. V. 547(7662). P. 232–235. <https://doi.org/10.1038/nature23263>
 63. Deglincerti A., Croft G.F., Pietila L.N. et al. Self-organization of the *in vitro* attached human embryo // Nature. 2016. V. 533 (7602). P. 251–254. <https://doi.org/10.1038/nature17948>
 64. Liu G., Wang W., Hu S. et al. Inherited DNA methylation primes the establishment of accessible chromatin during genome activation // Genome Res. 2018. V. 28(7). P. 998–1007. <https://doi.org/10.1101/gr.228833.117>
 65. Wu J., Xu J., Liu B. et al. Chromatin analysis in human early development reveals epigenetic transition during ZGA // Nature. 2018. V. 557(7704). P. 256–260. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0080-8>
 66. Fraser R., Lin C.J. Epigenetic reprogramming of the zygote in mice and men: on your marks, get set, go! // Reproduction. 2016. V. 152(6). P. R211–R222. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0376>
 67. Petruzza L., Van de Velde H., De Rycke M. Similar kinetics for 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during human preimplantation development *in vitro* // Mol. Reprod. Dev. 2016. V. 83(7). P. 594–605. <https://doi.org/10.1002/mrd.22656>
 68. Баранов В.С., Пендина А.А., Кузнецова Т.В. и др. Некоторые особенности статуса метилирования метафазных хромосом у зародышей человека доимплантационных стадий развития // Цитология. 2005. Т. 47. № 8. С. 723–730.
 69. Pendina A.A., Efimova O.A., Fedorova I.D. et al. DNA methylation patterns of metaphase chromosomes in human preimplantation embryos. Cytogenet Genome Res. 2011. V. 132(1–2). P. 1–7. <https://doi.org/10.1159/000318673>
 70. Efimova O.A., Pendina A.A., Tikhonov A.V. et al. Chromosome hydroxymethylation patterns in human zygotes and cleavage-stage embryos // Reproduction. 2015. V. 149(3). P. 223–233. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0343>
 71. White M.D., Angiolini J.F., Alvarez Y.D. et al. Long-lived binding of Sox2 to DNA predicts cell fate in the four-cell mouse embryo // Cell. 2016. V. 165(1). P. 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.032>
 72. De Iaco A., Planet E., Coluccio A. et al. DUX-family transcription factors regulate zygotic genome activation in placental mammals // Nat. Genet. V. 49(6). P. 941–945. <https://doi.org/10.1038/ng.3858>
 73. Geng L.N., Yao Z., Snider L. et al. DUX4 activates germline genes, retroelements, and immune mediators: Implications for facioscapulohumeral dystrophy // Dev. Cell. 2012. V. 22(1). P. 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.11.013>
 74. Morris S.A. Human embryos cultured *in vitro* to 14 days // Open Biol. 2017. V. 7(1). P. 170003. <https://doi.org/10.1098/rsob.170003>
 75. Кноппе А.Г. Краткий очерк по эмбриологии человека. 2-е изд. Л.: Медицина, 1967. 267 с.
 76. Rossant J. Human embryology: Implantation barrier overcome // Nature. 2016. V. 533(7602). P. 182–183. <https://doi.org/10.1038/nature17894>
 77. Amato P., Tachibana M., Sparman M., Mitalipov S. Three-parent *in vitro* fertilization: gene replacement for the prevention of inherited mitochondrial diseases //

- Fertil. Steril. 2014. V. 101(1). P. 31–35.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.11.030>
78. *Luo S., Valencia C.A., Zhang J. et al.* Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2018. V. 115(51). P. 13039–13044.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1810946115>
79. *Yang Y., Zhang X., Yi L., Hou Z.* Naive induced pluripotent stem cells generated from β-thalassemia fibroblasts allow efficient gene correction with CRISP/Cas 9 // Stem Cells Transl. Med. 2016. V. 5(1). P. 8–19.
<https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0157>
80. *Lanphier E., Urnov F., Heacker S.E. et al.* Do not edit human germ line // Nature. 2015. V. 519(7544). P. 410–411.
<https://doi.org/10.1038/519410a>
81. *Ma H., Marti-Gutierrez N., Park S.W. et al.* Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos // Nature. 2017. V. 548 (7668). P. 413–419.
<https://doi.org/10.1038/nature23305>
82. *Lander E., Baylis Fr., Zhang F. et al.* Adopt a moratorium on heritable genome editing // Nature. 2019. V. 567 (7747). P. 165–168.
<https://doi.org/10.1038/d41586-019-00726-5>

Advances in Developmental Genetics and Assisted Reproductive Technology Achievements

V. S. Baranov^{a, b, *}, I. Yu. Kogan^a, and T. V. Kuznetsova^a

^aOtt Research Institute of Obstetrics, Gynaecology and Reproductology, St. Petersburg, 199034 Russia

^bSaint-Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: baranov@vb2475.spb.edu

Experimental embryology achievements in previous century resulted in the birth of the first child conceived artificially. Besides its obvious social significance, the successful solution of the “test-tube babies”, provided also the unique chance for direct inspection of human embryos growing *in vitro* at their earlier stages. New technologies applied for human gametes and earlier embryos studies, combined with high resolution capacities of modern cytogenetic and molecular methods helped a lot in elaboration of efficient algorithms for ARTs and also provided solid background for illumination of many genetic problems of human development before implantation. The later include: input of chromosome aberrations and genome imprinting in pathology of early human development, cytogenetic and molecular mechanisms of the primary embryonic differentiation, genome epigenetic changes since fertilization through cleavage and blastulation, identification of genes responsible for early development and differentiation. Conspicuous achievements in ART also include the creation of three parental embryos as a new step for the treatment of mitochondrial diseases, elaboration of karyomapping technique amenable for the diagnostics of both chromosomal and genetic pathology, participation of paternal mitochondria delivered by the sperm in human development. New era in human development genetics and ART was recently mitigated by the genome editing technique. The necessity of its strict regulations for safe implementation of genome editing in human embryonic development is stressed. The area of special attention includes all studies of genome editing, production of artificial gametes growing of chimera embryos for the purposes of organ and tissue transplantation etc. Conspicuous delay of Russian science in developmental biology and the necessity of its urgent support from both fundamental science and clinical medicine is mentioned.

Keywords: human developmental genetics, assisted reproductive technologies, chromosomal anomalies, primary embryonic differentiation, genome editing.