

doi 10.18699/vjgb-25-75

Синдром Крузона: преимплантационное генетическое тестирование для семейного случая с полным и мозаичным вариантом заболевания

Е.В. Соловьёва ¹, М.М. Склеймова ¹, Л.И. Минайчева ¹, А.Ф. Гараева ¹, Е.М. Бакулина², Е.А. Ладыгина², О.Р. Канбекова³, Г.Н. Сеитова ¹

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра

Российской академии наук, Томск, Россия

² ООО «Витромед», Новосибирск, Россия

³ Областной перинатальный центр им. И.Д. Евтушенко, Томск, Россия

 elena.soloveva@medgenetics.ru

Аннотация. Синдром Крузона, относящийся к наследственным краниосиностозам, может быть как результатом наследования от одного из родителей, так и вариантом *de novo* мутаций в гене *FGFR2*. При подтвержденном молекулярно-генетическом диагнозе для семей высокого риска возможно проведение преимплантационного генетического тестирования моногенного заболевания (ПГТ-М). Однако на сегодняшний день в литературе мало сведений о таком подходе к профилактике данного заболевания. Целью нашей работы явилось описание клинического случая ЭКО/ИКСИ с ПГТ-М для синдрома Крузона с успешным исходом и подтверждающей диагностикой. Планирование и проведение ПГТ-М выполнены для супружеской пары (24 и 25 лет), в которой синдром Крузона был у мужа. У отца супруга синдром Крузона был в более легкой форме и патогенный вариант гена *FGFR2* присутствовал в мозаичном варианте. На подготовительном этапе подобрана система тестирования патогенного варианта NM_000141.5(*FGFR2*):c.1007A>G (p.Asp336Gly) гена *FGFR2* и сцепленных с геном полиморфных микросателлитных маркеров. Профиль STR-маркеров у отца супруга исключал химеризм по патогенному варианту и свидетельствовал о мозаицизме, затрагивающем половую линию. Молекулярно-генетический анализ проводили методом гнездовой ПЦР с детекцией фрагментным анализом для STR и рестрикционного анализа для патогенного варианта. В ходе программы ЭКО стимуляцию суперовуляции и эмбриологические процедуры выполняли по стандартным протоколам, оплодотворение проводили методом ИКСИ. Биопсия blastocyst выполнялась на 6-е сутки развития. При ПГТ-М использовали прямой анализ патогенного варианта и косвенный анализ по отобранному на подготовительном этапе информативным STR. Перенос размороженного эмбриона выполнен с учетом результатов преимплантационного тестирования. Нами было отобрано двенадцать STR, фланкирующих ген *FGFR2*, из них восемь информативных были использованы в ходе ПГТ-М. В программе ЭКО получено 15 зрелых ооцитов и в дальнейшем четыре blastocysts, которые были биопсированы. Один из четырех эмбрионов унаследовал нормальную отцовскую хромосому, в трех остальных выявлялся патогенный вариант и ассоциированный с ним гаплотип риска. В результате переноса в полость матки эмбриона, рекомендованного по результатам ПГТ-М, наступила одноплодная беременность. После рождения ребенка проведена молекулярно-генетическая диагностика, подтвердившая результат ПГТ-М. Представленный нами клинический случай демонстрирует эффективный пример применения ЭКО с ПГТ-М для предотвращения рождения больных детей в семьях с наследственными краниосиностозами.

Ключевые слова: синдром Крузона; ПГТ-М; преимплантационное генетическое тестирование; ЭКО, мозаицизм; ген *FGFR2*

Для цитирования: Соловьёва Е.В., Склеймова М.М., Минайчева Л.И., Гараева А.Ф., Бакулина Е.М., Ладыгина Е.А., Канбекова О.Р., Сеитова Г.Н. Синдром Крузона: преимплантационное генетическое тестирование для семейного случая с полным и мозаичным вариантом заболевания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(5):685-692. doi 10.18699/vjgb-25-75

Финансирование. Работа выполнена при финансировании в рамках государственного задания № 123041700028-8 Минобрнауки России (Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский центр Российской академии наук).

Crouzon syndrome: preimplantation genetic testing for a familial case with a whole and a mosaic variant of the disease

E.V. Soloveva ¹, M.M. Skleimova ¹, L.I. Minaycheva ¹, A.F. Garaeva ¹, E.M. Bakulina², E.A. Ladygina², O.R. Kanbekova³, G.N. Seitova ¹

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

² Vitromed LLC, Novosibirsk, Russia

³ Regional Perinatal Center named after I.D. Yevtushenko, Tomsk, Russia

 elena.soloveva@medgenetics.ru

Abstract. Crouzon syndrome, which is a hereditary craniosynostosis, can be the result of inheritance from either parent, as well as *de novo* mutations in the *FGFR2* gene. With a confirmed molecular genetic diagnosis, preimplantation genetic testing for monogenic diseases (PGT-M) is available for high-risk families. However, there is currently little information in the literature about using this approach to prevent this condition. The aim of our study was to describe the clinical case of IVF/ICSI with PGT-M for Crouzon syndrome with a successful outcome and confirmatory diagnostics. PGT-M was planned and performed for a married couple (aged 24 and 25), in which the husband had Crouzon syndrome. The husband's father had a milder form of Crouzon syndrome and the pathogenic variant of the *FGFR2* gene was in a mosaic form. During preparation, a testing system was selected for the pathogenic variant NM_000141.5(*FGFR2*):c.1007A>G (p.Asp336Gly) of the *FGFR2* gene, and gene-linked polymorphic microsatellite markers. The STR markers in the husband's father excluded chimerism for the pathogenic variant and indicated mosaicism with the involvement of germ cells. Molecular genetic analysis was performed using a nested PCR, with detection by fragment analysis for STRs and restriction analysis of the pathogenic variant. During the IVF program, superovulation stimulation and embryological procedures were performed according to standard protocols. Fertilization was achieved using the ICSI method, and blastocyst biopsy was done on the sixth day of development. For PGT-M, a direct analysis of pathogenic variants and an indirect analysis of selected informative STRs were used. The thawed embryos were transferred based on the results of preimplantation testing. We selected twelve STRs flanking the *FGFR2* gene, eight informative ones were used during PGT-M. In the IVF program, 15 mature oocytes were obtained, then four blastocysts were biopsied. One of the four embryos inherited a normal paternal chromosome, the other three had the pathogenic variant and the associated risk haplotype. A singleton pregnancy has occurred as a result of embryo transfer recommended after PGT-M. Following the child's birth, molecular diagnostics were performed, confirming the PGT-M result. The presented clinical case provides an effective example of IVF with PGT-M to prevent the birth of affected children in families with hereditary craniosynostosis.

Key words: Crouzon syndrome; PGT-M; preimplantation genetic testing; IVF; mosaicism; *FGFR2* gene

For citation: Soloveva E.V., Skleimova M.M., Minaycheva L.I., Garaeva A.F., Bakulina E.M., Ladygina E.A., Kanbekova O.R., Seitova G.N. Crouzon syndrome: preimplantation genetic testing for a familial case with a whole and a mosaic variant of the disease. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(5):685–692. doi 10.18699/vjgb-25-75

Введение

Синдром Крузона относится к обширной гетерогенной группе краниосиностозов – врожденных дефектов, характеризующихся преждевременным сращением одного или нескольких швов свода черепа до завершения роста и развития головного мозга, что приводит к ограничению роста черепа, головного мозга, лица и развития центральной нервной системы. Среди краниосиностозов синдромальные случаи составляют около 15 %. На сегодняшний день выявлено более 180 синдромов краниосиностоза. Около 8 % случаев являются семейными или наследственными (Al-Namnam et al., 2019). Среди наследственных краниосиностозов наиболее часто встречается синдром Крузона (OMIM 123500). Он связан с мутациями гена рецептора фактора роста фибробластов 2 (*FGFR2*), который локализован на хромосоме 10 (10q26.13). Белок *FGFR2* вовлечен в клеточную сигнализацию, и нарушение *FGF/FGFR2* сигнального пути приводит к нарушению баланса дифференцировки, пролиферации и апоптоза (Al-Namnam et al., 2019; Yarijakis et al., 2023).

Синдром Крузона встречается в мире примерно в 16.5 случая на миллион живорожденных (1:60000). Данных о частоте заболевания в России нами не найдено. Болезнь имеет аутосомно-доминантный тип наследования с неполной пенетрантностью и изменчивой экспрессивностью. Приблизительно в 70 % случаев заболевание наследуется от одного из родителей, в остальных – является следствием мутации *de novo* (Al-Namnam et al., 2019). Впервые синдром описан Луи Эдуардом Октавом Крузоном в 1912 г.

Заболевание, как правило, проявляется в первые три года жизни. Его можно заподозрить на антенатальном этапе с помощью ультразвукового исследования. Также его

часто обнаруживают при рождении по классическим признакам у новорожденного, которые включают краниосиностоз, гипоплазию средней части лица, проптоз (экзофтальм) и в некоторых случаях клювовидный нос. Другие частые проявления синдрома включают коронарный краниосиностоз с другими сращениями черепных швов, брахицефалию, гипертелоризм, выступающие лобные бугры, косоглазие, орбитальный проптоз, нижнечелюстной прогнатизм и верхнечелюстную гипоплазию. Эти признаки либо становятся более выраженными, либо могут регрессировать со временем (Al-Namnam et al., 2019). К распространенным явлениям относятся потеря слуха (55 %) и сращение позвонков C2 и C3 (30 %). Другим проявлением может быть прогрессирующая гидроцефалия (30 %). Умственные способности пациентов обычно нормальные, однако в ряде случаев повышенное внутричерепное давление может приводить к интеллектуальной недостаточности. Дифференциальная диагностика синдрома Крузона включает синдром Аперта и синдром Пфайффера. Исторически заболевания описаны как отдельные, однако перекрывающийся спектр молекулярно-генетических нарушений позволяет предположить, что эти состояния являются континуумом (Колтунов, 2011; Al-Namnam et al., 2019).

Лечение синдрома Крузона основано на тяжести проявлений. Для оптимизации лечения необходима их комплексная оценка многопрофильной командой специалистов. Основным методом лечения – хирургический. Он позволяет выполнить коррекцию лицевого черепа и глазниц с целью оптимизации мозгового кровотока, предотвращения последствий повышенного внутричерепного давления, слепоты и умственной отсталости. Хирургическое вмешательство может быть выполнено поэтапно или ком-

бинированно в зависимости от того, насколько серьезно и функционально поражены пациенты, и в соответствии с их возрастом (Колтунов, 2011; Соколова и др., 2024).

Молекулярно-генетическое обследование на сегодняшний день является важнейшим звеном диагностики синдрома Крузона. При наличии высокого риска передачи синдрома Крузона потомству возможно применение преимплантационного генетического тестирования данного моногенного заболевания (ПГТ-М) (Wenger et al., 1993–2025). Для этого супружеской паре необходимо прибегнуть к экстракорпоральному оплодотворению (ЭКО). ПГТ-М в настоящее время проводится в мире для достаточно широкого спектра моногенных болезней. Однако в отношении синдрома Крузона в литературе нам удалось найти описание только одного клинического случая ПГТ-М (Abou-Sleiman et al., 2002).

В нашей работе мы представили клинический случай ЭКО/ИКСИ с ПГТ-М с успешным исходом и подтверждающей диагностикой.

Материал и методы

Экстракорпоральное оплодотворение с ПГТ-М проведено для супружеской пары (женщина 24 лет, мужчина 25 лет) с диагнозом синдром Крузона у мужа. Фенотипические проявления у мужчины были характерными: гипертелоризм, клювовидный нос, экзофтальм (выражен не резко), гипоплазия средней части лица, высокое небо, выступающий подбородок. По данным клинико-генеалогического анализа синдром Крузона также установлен у его отца. Клинические проявления у отца супруга более легкие, в частности нет экзофтальма, гипоплазии средней части лица, гипертелоризма. Семейный патогенный вариант NM_000141.5(FGFR2):c.1007A>G (p.Asp336Gly) в гетерозиготном состоянии выявлен у супруга и его отца в результате секвенирования по Сэнгеру; для отца супруга был отмечен «14 % мозаицизм либо химеризм с гетерозиготой» (ООО «Геноаналитика», Москва, 2022 г.). В настоящей статье использовано сокращенное обозначение патогенного варианта – D336G. Вариант описан в базе данных ClinVar (Variation ID: 374815) и ассоциирован с развитием синдрома Крузона (OMIM 123500). Не менее трех программ предсказания патогенности *in silico* подтверждают патогенный эффект варианта на ген или продукт гена (AlphaMissense, Revel, Aggregated Prediction). Вариант нуклеотидной последовательности не зарегистрирован в контрольной выборке The Genome Aggregation Database v4.1.0 и базе данных популяционных частот генетических вариантов населения Российской Федерации ФМБА России (версия приложения 1.1.2, версия базы 59.1, <https://gdbpor.nir.cspfm.ru>). Этот миссенс-вариант расположен в гене, где миссенс-варианты часто являются причиной возникновения заболевания.

Для пары проведено детальное медико-генетическое консультирование, включающее вопросы планируемой системы молекулярно-генетического тестирования и консультирование по вопросам ВРТ (вспомогательных репродуктивных технологий). На все процедуры получены добровольные информированные согласия от всех лиц, вовлеченных в исследование.

Биологическим материалом для подготовительного этапа служили образцы венозной крови супругов, родителей супруга, а также добровольного неродственного семье донора (для тестовой ДНК и единичных лимфоцитов), забранные в пробирки-вакутейнеры с ЭДТА. Для постнатальной диагностики использовали высушенные пятна крови новорожденного на фильтровальном бланке. Выделение ДНК из венозной крови проводили сорбционным методом из 100 мкл крови с помощью набора «ДНК-сорб-В» (Амплисенс, Россия). ДНК из образца высушенного пятна крови выделяли с помощью набора «ПРОБА-МЧ-СП-DWP» («ДНК-Технология», Россия) на роботизированной станции Auto-Pure 96 (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd, Китай). Для валидации системы в качестве биологического материала применяли образцы единичных лимфоцитов, для получения которых из образца крови выделяли взвесь мононуклеаров центрифугированием крови в градиенте плотности раствора фиколла. Затем стеклянной микропипеткой для биопсии под микроскопом с использованием раствора поливинилпирролидона забирали единичные лимфоциты и помещали каждый в индивидуальные микропробирки с лизирующим раствором. Лизирующий раствор для единичных лимфоцитов и образцов трофобласта эмбрионов содержал протеиназу К, тритон X-100 и твин 20 (Verlinsky, Kuliev, 2004).

Для проведения ПГТ-М была разработана система тестирования, включающая анализ патогенного варианта D336G гена *FGFR2* и полиморфных STR-маркеров (short tandem repeats), сцепленных с геном *FGFR2*. STR выбирали в пределах 1 млн п.н. от патогенного варианта с гетерозиготностью 0.8–0.9 для динуклеотидных повторов и не ниже 0.7 для три-тетрануклеотидных. На подготовительном этапе проводили реакции ПЦР и оптимизацию (в градиентной ПЦР при необходимости) для всех фрагментов на тестовой ДНК, затем анализировали образцы семьи для выявления информативных STR. Разработанную систему валидировали на тестовых единичных лимфоцитах ($N = 8$).

Тестирование образцов ДНК членов семьи осуществляли с помощью стандартной ПЦР (ПЦР2) в объеме 20 мкл с флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными праймерами. Для тестирования единичных клеток, как в ходе ПГТ-М, так и при валидации на лимфоцитах на подготовительном этапе, применяли гнездовую ПЦР. Первый раунд ПЦР (ПЦР1) проводили мультиплексно в объеме 50 мкл. 1 мкл продукта ПЦР1 использовали в качестве матрицы для ПЦР2. Во все серии амплификации включали отрицательные и положительные контроли. Общую схему молекулярно-генетического тестирования, а также условия и программы амплификации применяли согласно рекомендациям (Verlinsky, Kuliev, 2004).

Продукты ПЦР2 предварительно анализировали в 7 % полиакриламидном геле для оценки нагрузки образцов на капиллярный электрофорез и качества отрицательных контролей. Фрагментный анализ STR-маркеров проводили методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе «Нанофор 05» (Институт аналитического приборостроения, Россия). Результаты фрагментного анали-

за обрабатывали в программе GeneMarker (SoftGenetics, США). Анализ патогенного варианта включал рестрикционный анализ HspAI с детекцией в 7 % полиакриламидном геле. Для окраски гелей использовали краситель GelRed (Biotinum, USA).

При планировании ЭКО супружеская пара прошла стандартное обследование, согласно отечественным рекомендациям «Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация. Клинические рекомендации (протокол лечения)» (2019). Контролируемую стимуляцию суперовуляции проводили по стандартному короткому протоколу с использованием рекомбинантного ФСГ (фолликулостимулирующего гормона) и антагонистов. Доза ФСГ подбиралась индивидуально. Триггер овуляции осуществляли назначением 0.2 мг препарата «Декапептил» (Ferring GmbH, Германия) при достижении по меньшей мере тремя фолликулами размера 17 мм по данным УЗИ-мониторинга. Через 36 ч выполняли трансвагинальную пункцию фолликулов под контролем УЗИ. Для анализа эякулята использовали стандартные критерии ВОЗ (Руководство ВОЗ..., 2012).

Оплодотворение проводилось методом ИКСИ (инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита). Эмбриологические процедуры и биопсию эмбрионов выполняли с учетом отечественных и международных рекомендаций (ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group et al., 2020; Оценка ооцитов..., 2021). Для культивирования эмбрионов применяли одношаговую среду “SAGE 1-Step™” (ORIGIO, Дания). Биопсию эмбрионов отличного и хорошего качества выполняли на 6-е сутки развития методом «флип». Полученные фрагменты трофобласты после отмывки в фосфатном буфере (PBS) переносили в микропробирки с 5 мкл лизирующего буфера и замораживали при –20 °С. Сразу после биопсии бластоцисты витрифицировали с использованием сред и носителей Kitazato (Kitazato Corporation, Dibimed-Biomedical Supply, Испания).

ПГТ-М выполняли методом гнездовой ПЦР по схеме, разработанной на подготовительном этапе, с учетом ука-

занных выше условий и принимая во внимание международные рекомендации (ESHRE PGT-M Working Group et al., 2020).

Подготовка к переносу размороженного эмбриона осуществлялась в естественном цикле с учетом результатов ПГТ-М. Использовали среды для размораживания Kitazato (Kitazato Corporation, Dibimed-Biomedical Supply, Испания), катетер для переноса Guardia™ Access ETEmbryo Transfer Catheter (COOK Medical, США).

Диагностика беременности выполнялась стандартно анализом хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) на 14-й день после переноса эмбриона в полость матки с последующим УЗИ-обследованием на сроке 7 недель. Инвазивная пренатальная диагностика не проводилась.

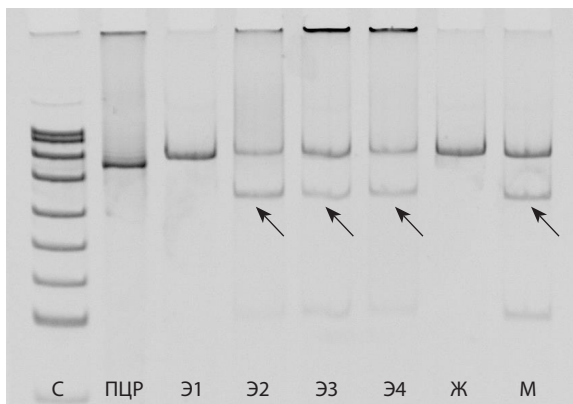
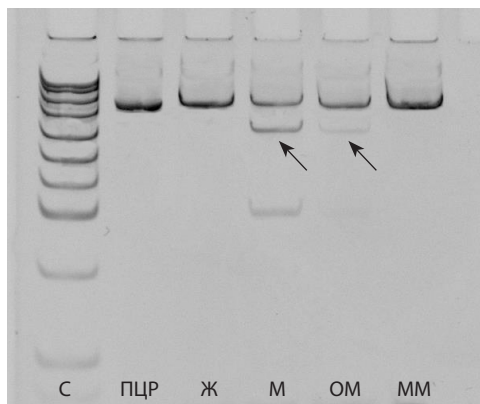
Постнатальная диагностика выполнялась с использованием образцов высушенных пятен крови новорожденного. В молекулярно-генетическое тестирование новорожденного включали все локусы, протестированные в ходе ПГТ-М.

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

Результаты

В ходе подготовительного этапа ПГТ-М для семьи с высоким генетическим риском (50 %) синдрома Крузона была разработана тест-система, включающая анализ патогенного варианта D336G и 12 полиморфных STR-маркеров. Наличие патогенного варианта подтверждено у супруга и его отца методом рестрикционного анализа, использованного как для предварительного обследования семьи, так и непосредственно в ПГТ-М (см. рисунок).

Мы зафиксировали различие в интенсивности рестрикционных фрагментов у супруга и его отца. У отца супруга интенсивность фрагмента, соответствующего аллелю с патогенным вариантом, была существенно ниже в сравнении с нормальным аллелем. Это согласовывалось с



Результат тестирования патогенного варианта D336G гена *FGFR2* методом рестрикционного анализа с детекцией в геле (инвертированное изображение) в образцах семьи на подготовительном этапе и в образцах эмбрионов в ходе ПГТ-М. Ж – женщина/жена; М – мужчина/муж; ОМ – отец мужа; ММ – мать мужа; Э1–Э4 – образцы эмбрионов; ПЦР – продукт ПЦР без обработки эндонуклеазой; С – размерный стандарт pUC19/Mspl.

Таблица 1. Результаты подготовительного этапа ПГТ-М для семьи с синдромом Крузона

№ п/п	STR/ген, повтор (расстояние от патогенного варианта, млн п. н.), локализация (chr10:GRCh37/hg19)	Аллели, выявленные в образцах, п. н.			
		Муж	Жена	Отец мужа	Мать мужа
1	AG (0.98) 122297505–122297597	255/257	(239/247)	255/245	247/257
2	AT (0.85) 122422706–122422730	354/354	374/374	354/374	352/354
3	ACAG (0.81) 122466425–122466476	250/250	208/208	250/208	246/250
4	AAT (0.74)* 122533089–122533125	282/273	(291/294)	282/291	282/273
5	AC (0.68) 122593191–122593232	160/152	(162/160)	160/154	160/152
6	AC (0.55) 122725637–122725689	236/242	(254/246)	236/258	234/242
7	<i>FGFR2</i>	D336G/N	N/N	D336G/N	N/N
8	AC (0.01) 123283616–123283661	256/258	(258/260)	256/256	246/258
9	AT (0.22) 123493200–123493222	186/186	(186/194)	186/186	186/186
10	AAT (0.61) 123888576–123888611	161/149	(161/149)	161/149	152/149
11	AG (0.66) 123935589–123935661	136/128	(128/108)	136/144	138/128
12	AC (0.76) 124039027–124039061	246/244	238/238	246/232	248/244
13	ATC (0.95) 124227919–124227959	90/96	(96/87)	90/90	87/96

Примечание. Жирным шрифтом и подчеркиванием обозначены аллели, сцепленные с патогенным вариантом; скобками отмечены аллели с неустановленным в ходе подготовительного этапа сцеплением; заливкой отмечены неинформативные STR. * Отмечен локус, не прошедший валидацию на единичных клетках.

результатами молекулярно-генетического обследования, предоставленными семьей для подготовительного этапа, в которых также был отмечен мозаицизм у отца супруга.

Информативность STR-маркеров для ПГТ-М установлена семейным анализом, проведенным на основании тестирования образцов родителей супруга. Подобранные нами и изученные на образцах семьи полиморфные STR-маркеры представлены в табл. 1.

Из двенадцати протестированных STR информативными в отношении хромосомы супруга, несущей патогенный вариант, были девять. У отца супруга по всему спектру исследованных высокополиморфных микросателлитных маркеров не выявлено никаких дополнительных аллелей, что исключает предположение о химеризме.

Далее система тестирования была проверена на образцах единичных лимфоцитов и продуктах полногеномной амплификации эмбрионов. Для всех STR, за исключением одного, подтвердилась приемлемая амплификация по интенсивности фрагментов, отсутствию неспецифических фрагментов, форме пика. Один из STR – AAT, расположенный на расстоянии 0.74 млн п. н., был исключен из системы ввиду отсутствия амплификации на единичных клетках.

В ходе лечебного цикла ЭКО была использована стартовая доза гонадотропинов 200 МЕ ФСГ + 75 МЕ ЛГ (лютеинизирующего гормона). Общая доза гонадотропинов составила 1950 МЕ ФСГ + 600 МЕ ЛГ. Осложнений в процессе стимуляции не отмечено. В результате пункции 23 фолликулов получен 21 ооцит, в том числе 15 зрелых. Оплодотворение проводилось методом ИКСИ с целью снижения контаминации родительской ДНК при последующем тестировании фрагментов эмбрионов. Эякулят супруга был с тератозооспермией; концентрация сперма-

тозоидов 167 млн/мл, из них прогрессивно-подвижных – 49 %. На следующие сутки после оплодотворения зафиксировано образование 12 двух-пронуклеарных зигот. На этапе дробления (3-и сутки) развивались 11 эмбрионов. Четыре эмбриона достигли стадии бластоцисты, все они были успешно биопсированы для проведения генетического тестирования.

Фрагменты трофэктодермы четырех эмбрионов были протестированы на семейный патогенный вариант, ответственный за синдром Крузона, и сцепленные STR-маркеры, подобранные на подготовительном этапе. В преимплантационное исследование были включены только информативные STR, валидированные на единичных клетках.

Результаты преимплантационного анализа патогенного варианта гена *FGFR2* представлены на рисунке. При ПГТ-М в образцах трех эмбрионов обнаружен отцовский патогенный вариант D336G гена *FGFR2* в гетерозиготном состоянии. В образце первого эмбриона выявлен нормальный аллель гена *FGFR2*. Генотип эмбриона 1 может быть интерпретирован как гомозигота по нормальному аллелю, однако ввиду высокого риска ADO («выпадение» аллеля – allele dropout) при ПГТ-М генотип интерпретировали только совместно с результатами STR. Полные результаты преимплантационного тестирования представлены в табл. 2.

Все предположительно гомозиготные профили в образцах эмбрионов (см. табл. 2) указаны как один аллель из предосторожности в интерпретации в связи с возможным явлением ADO. Результаты тестирования STR показали, что в образцах трех эмбрионов, несущих патогенный вариант, присутствовали отцовские аллели, сцепленные с патогенным вариантом гена. В образце эмбриона 1 уста-

Таблица 2. Результаты ПГТ-М и подтверждающей диагностики для семьи с синдромом Крузона

№ п/п	STR/ген, повтор (млн п. н.)	Аллели, выявленные в образцах, п. н.						
		ПГТ-М: образцы эмбрионов				Контрольные образцы семьи		Ребенок (ЭКО-ПГТ-М)
		Э1	Э2	Э3	Э4	Муж	Жена	
1	AG (0.98)	257/247	255 /239	255 /247	255 /247	255 /257	239/247	257/247
2	AC (0.68)	152/160	160 /162	160	160	160 /152	162/160	152/160
3	AC (0.55)	242/246	236 /254	236 /246	236 /246	236 /242	254/246	242/246
4	<i>FGFR2</i>	<i>N</i>	D336G /N	D336G /N	D336G /N	D336G /N	N/N	N/N
5	AC (0.01)	258/260	256 /258	256 /260	256 /260	256 /258	258/260	258/260
6	AAT (0.61)	149	161	161 /149	161 /149	161 /149	161/149	149/149
7	AG (0.66)	128/108	136 /128	136 /108	136 /108	136 /128	128/108	128/108
8	AC (0.76)	244/238	246 /238	246 /238	246 /238	246 /244	238/238	244/238
9	ATC (0.95)	96/87	90 /96	90 /87	90 /87	90 /96	96/87	96/87

Примечание. Жирным шрифтом и подчеркиванием обозначены аллели, сцепленные с патогенным вариантом; курсивом обозначены локусы, которые по отдельности в образцах эмбрионов могут быть интерпретированы как гомозигота либо один аллель вследствие ADO второго аллеля.

новлено наличие отцовского нормального гаплотипа наряду с одним из материнских гаплотипов, что подтвердило нормальный гомозиготный статус эмбриона в отношении патогенного варианта.

Генетическое тестирование на анеуплоидии не выполнялось на основании решения супругов по результатам медико-генетического консультирования.

Перенос размороженного эмбриона номер 1 в полость матки был проведен по итогам преимплантационного тестирования. Криоперенос осуществлен в естественном модифицированном цикле с триггером овуляции (ХГЧ 6500 МЕ).

В результате наступила одноплодная беременность, подтвержденная результатами ультразвукового исследования. Беременность протекала без осложнений. Стандартный пренатальный скрининг не выявил каких-либо осложнений в развитии плода. Рекомендованная по результатам медико-генетического консультирования инвазивная пренатальная диагностика для проверки генотипа плода не проводилась в связи с опасениями пациентки из-за рисков осложнений. Беременность была разрешена оперативно кесаревым сечением в 39 недель в мае 2024 г. Родилась здоровая девочка с массой тела 3480 г; оценка по шкале Апгар 7/8 по данным выписного эпикриза.

По образцу высушенной крови новорожденного выполнено подтверждающее генетическое тестирование на семейный вариант синдрома Крузона. Тестирование делали на все локусы, включенные в ПГТ-М (см. табл. 2). В результате у ребенка выявлен гомозиготный по нормальному аллелю гена *FGFR2* генотип, который подтверждался соответствующим отцовским гаплотипом. Результаты постнатальной подтверждающей диагностики полностью совпали с результатами тестирования эмбриона 1 в ходе ПГТ-М.

Обсуждение

В нашей статье представлено детальное описание клинического случая проведения ЭКО с ПГТ-М для предотвращения рождения ребенка с синдромом Крузона в

семье, где супруг и его отец страдали этим заболеванием. Семейный патогенный вариант гена *FGFR2* у отца супруга присутствовал в мозаичной форме и не являлся следствием химеризма, что доказывают наши данные по микросателлитному анализу. Мозаичный вариант у отца супруга, вероятно, обусловил более мягкое клиническое проявление заболевания. Для эмбрионов мы фиксировали стандартный гетерозиготный (немозаичный) вариант выявления патогенного варианта, как и для супруга (см. рисунок).

Случай генеративного и соматического мозаицизма для такого же патогенного варианта с.1007A>G (p.Asp336Gly), что и в нашем клиническом случае, описан в работе (Goriely et al., 2010). У матери, не имеющей проявления синдрома Крузона, обнаружен гетерозиготный мозаичный вариант с.1007A>G (p.Asp336Gly) примерно в 25–30 % клеток крови и слюны. У ребенка с синдромом Крузона данный патогенный вариант присутствовал, как и в описанной нами семье, в стандартной гетерозиготной форме (Goriely et al., 2010).

Примеры передачи аутосомно-доминантного заболевания от родителя, имеющего мозаичное носительство патогенного варианта, обнаружены и для других нозологий, в частности для аутосомно-доминантного поликистоза почек (Norpp et al., 2020). Распространенность такого явления для разных наследственных заболеваний в настоящее время не ясна.

В ходе программы ЭКО получено четыре бластоцисты, которые были успешно пробиопсированы и протестированы в отношении синдрома Крузона. Использован подход анализа патогенного варианта с отобранными на подготовительном этапе сцепленными информативными STR-маркерами. Мы использовали гнездовую ПЦР и не применяли полногеномную амплификацию, поскольку комбинация ПГТ-М с анализом анеуплоидии для данного клинического случая не проводилась. Примененный нами подход позволил сделать однозначные выводы в отношении наследования хромосомы, ответственной за семейный вариант синдрома Крузона для каждого эмбриона. Доми-

нантный характер наследования заболевания определяет 50 % риск для эмбрионов. В нашем случае три (75 %) из четырех эмбрионов имели патогенный вариант. Один эмбрион имел нормальный статус, и его перенос привел к достижению беременности и рождению здорового ребенка.

В литературе мало данных о ПГТ-М для синдрома Крузона. В 2002 г. опубликованы результаты исследовательской группы из Великобритании, сообщающие о первом успешном ПГТ в отношении синдрома Крузона (Abou-Sleiman et al., 2002; Harper et al., 2002). В обеих статьях описан один клинический случай: в одной статье более детально представлены результаты тестирования (Abou-Sleiman et al., 2002), во второй сообщается об исходах (Harper et al., 2002). Для супружеской пары, где синдром Крузона был у женщины, преимплантационное тестирование выполнено в двух лечебных циклах ЭКО. Указывается, что в анамнезе было рождение девочки с синдромом Крузона, которая впоследствии умерла при корригирующей операции. Система преимплантационного тестирования включала анализ патогенного варианта методом SSCP (single strand conformation polymorphism – метод анализа однострессового конформационного полиморфизма). При подготовке к диагностике протестированы два внутривенных SNP, однако супруги были неинформативны (Abou-Sleiman et al., 2002). В преимплантационный анализ помимо фрагмента гена *FGFR2* был включен несцепленный локус D21S11 для контроля амплификации. Всего за два цикла было проанализировано 23 эмбриона 3-го дня развития, использована стратегия забора двух blastomeres при биопсии. Восемь были диагностированы как нормальные, девять – как аномальные, и шесть не дали результатов. Пять эмбрионов были перенесены в ходе двух процедур переноса эмбрионов. Второй цикл ПГТ привел к двуплодной беременности, однако сердцебиение было только у одного эмбриона. Пренатальная диагностика не проводилась по желанию супружеской пары, подтверждающая диагностика проведена постнатально. Родился здоровый мальчик (Harper et al., 2002).

Других описаний ПГТ-М для синдрома Крузона в литературе нами не найдено. В нашей работе мы не столкнулись с какими-либо специфическими сложностями ПГТ-М в отношении заболевания, гена и конкретного патогенного варианта. Возможно, что из-за сложных молекулярных механизмов, вовлеченных в развитие краниосиностозов, эта группа пока в меньшей степени привлекала внимание специалистов в отношении ПГТ-М как метода предотвращения заболевания. Наш опыт доказывает, что для вариантов моногенного наследования ПГТ-М может успешно применяться.

В сравнении с вышеописанным клиническим случаем из литературы в нашем случае беременность удалось достичь в первом лечебном цикле ЭКО с ПГТ. Отличия можно отметить в ряде аспектов всего процесса, связанных с изменениями технологий в данной области. Для преимплантационного тестирования у нас было меньше эмбрионов. В целом при тестировании образцов трофобластической оболочки эмбрионов 5–6 суток развития образцов для ПГТ-М меньше, чем при тестировании blastomeres 3-го дня развития, поскольку происходит естественная селекция эмбрионов с 3-го по 5-й день.

В ходе генетического тестирования мы использовали более детальную систему, включающую четкое выявление патогенного варианта методом рестрикционного анализа и не менее двух информативных для семьи фланкирующих STR. Для анализа собственно патогенного варианта применен рестрикционный анализ, основанный на природном сайте для эндонуклеазы рестрикции. Такой подход оказался более информативным, чем метод SSCP. В настоящее время в области ПГТ-М предложен достаточно большой арсенал инновационных полногеномных методов (De Rycke, Verckmoes, 2020). В то же время важно учитывать возможности таких методов для каждого конкретного случая.

Включенные в наше исследование STR дают возможность выявить все сложности амплификации и интерпретации при ПГТ, включая ADO, контаминацию, рекомбинацию. Даже при условии отсутствия амплификации для патогенного аллеля гаплотипы позволили бы четко идентифицировать эмбрионы, несущие хромосому с отцовским патогенным вариантом. По современным стандартам таргетный преимплантационный анализ без сцепленных информативных маркеров не рекомендован (ESHRE PGT-M Working Group et al., 2020).

В представленном нами клиническом случае не проводилось ПГТ-А. Супруги имели относительно молодой возраст; других показаний к ПГТ-А также не было.

Заключение

Представлен клинический случай ЭКО с ПГТ-М для супружеской пары с высоким риском синдрома Крузона с успешным исходом, подтвержденный постнатальной диагностикой. В сравнении с единственным описанным в литературе случаем наши результаты отражают более современный и в некоторых аспектах более надежный подход к ЭКО с ПГТ-М синдрома Крузона. В обследованной нами семье у отца супруга патогенный вариант гена *FGFR2* был в мозаичной форме, тогда как у самого супруга и, соответственно, в эмбрионах – в стандартном гетерозиготном состоянии. Использованный в работе микросателлитный анализ исключил химеризм. Вопросы передачи доминантных заболеваний при родительском мозаицизме требуют дальнейшего исследования. Представленный нами клинический случай демонстрирует эффективный пример применения ЭКО с ПГТ-М для предотвращения рождения больных детей в семьях с наследственными краниосиностозами.

Список литературы / References

- Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация. Клинические рекомендации (протокол лечения). Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2019 [Assisted Reproductive Technology and Artificial Insemination. Clinical guidelines (treatment protocol). Ministry of Health of the Russian Federation, 2019 (in Russian)]
- Колтунов Д.Е. Синдром Крузона: этиология и клинические проявления. *Вопросы практической педиатрии*. 2011;6(5):49-52 [Koltunov D.E. Crouzon syndrome: etiology and clinical manifestations. *Clinical Practice in Pediatrics*. 2011;6(5):49-52 (in Russian)]
- Оценка ооцитов и эмбрионов в лаборатории ВРТ. Методические рекомендации. Российская Ассоциация Репродукции Человека, 2021. https://www.rahr.ru/d_pech_mat_metod/MR_evaluation_of_embryos.pdf

- [Evaluation of Oocytes and Embryos in the ART Laboratory. Methodological recommendations. Russian Association of Human Reproduction, 2021. https://www.rahr.ru/d_pech_mat_metod/MR_evaluation_of_embryos.pdf (in Russian)]
- Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Пятое изд. М.: КАПИТАЛ ПРИНТ, 2012. Доступно: <https://iris.who.int/handle/10665/112544>
- [WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Geneva: World Health Organization, 2010. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/44261>]
- Соколова М.А., Саркисян Е.А., Шумилов П.В., Ворона Л.Д., Левченко Л.А., Ишутина Ю.Л., Шабельникова Е.И., Крапивкин А.И. Синдром Крузона: особенности клинических проявлений, ведения, диагностики и исходов у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2024;69(1):78-85. doi 10.21508/1027-4065-2024-69-1-78-85
- [Sokolova M.A., Sarkisyan E.A., Shumilov P.V., Vorona L.D., Levchenko L.A., Ishutina Yu.L., Shabelnikova E.I., Krapivkin A.I. Crouzon syndrome: features of clinical manifestations, management and outcomes in children. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*. 2024;69(1):78-85. doi 10.21508/1027-4065-2024-69-1-78-85 (in Russian)]
- Abou-Sleiman P.M., Apessos A., Harper J.C., Serhal P., Delhanty J.D.A. Pregnancy following preimplantation genetic diagnosis for Crouzon syndrome. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(3):304-309. doi 10.1093/molehr/8.3.304
- Al-Namnam N.M., Hariri F., Thong M.K., Rahman Z.A. Crouzon syndrome: genetic and intervention review. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2019;9(1):37-39. doi 10.1016/j.jobcr.2018.08.007
- De Rycke M., Berckmoes V. Preimplantation genetic testing for monogenic disorders. *Genes*. 2020;11(8):871. doi 10.3390/genes11080871
- ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group; Kokkali G., Cotichio G., Bronet F., Celebi C., Cimadomo D., Goossens V., Liss J., Nunes S., Sfontouris I., Vermeulen N., Zakharova E., De Rycke M. ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT. *Hum Reprod Open*. 2020;2020(3):hoaa020. doi 10.1093/hropen/hoaa020
- ESHRE PGT-M Working Group; Carvalho F., Moutou C., Dimitriadou E., Dreesen J., Giménez C., Goossens V., Kakourou G., Vermeulen N., Zuccarello D., De Rycke M. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders. *Hum Reprod Open*. 2020;2020(3):hoaa018. doi 10.1093/hropen/hoaa018
- Goriely A., Lord H., Lim J., Johnson D., Lester T., Firth H.V., Wilkie A.O. Germline and somatic mosaicism for *FGFR2* mutation in the mother of a child with Crouzon syndrome: implications for genetic testing in “paternal age-effect” syndromes. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(8):2067-2073. doi 10.1002/ajmg.a.33513
- Harper J.C., Wells D., Piyamongkol W., Abou-Sleiman P., Apessos A., Ioulianos A., Davis M., Doshi A., Serhal P., Ranieri M., Rodeck C., Delhanty J.D.A. Preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders: experience with five single gene disorders. *Prenat Diagn*. 2002;22(6):525-533. doi 10.1002/pd.394
- Hopp K., Cornec-Le Gall E., Senum S.R., Te Paske I.B.A.W., Raj S., Lavu S., Baheti S., ... Rahbari-Oskoui F.F., Torres V.E.; HALT Progression of Polycystic Kidney Disease Group, the ADPKD Modifier Study; Harris P.C. Detection and characterization of mosaicism in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 2020; 97(2):370-382. doi 10.1016/j.kint.2019.08.038
- Verlinsky Y., Kuliev A. An Atlas of Preimplantation Genetic Diagnosis. CRC Press, 2004. doi 10.1201/b14655
- Wenger T., Miller D., Evans K. *FGFR* Craniosynostosis syndromes overview. In: GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993–2025. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1455/>
- Yapijakis C., Pachis N., Sotiriadou T., Vaila C., Michopoulou V., Vassiliou S. Molecular mechanisms involved in craniosynostosis. *In Vivo*. 2023;37(1):36-46. doi 10.21873/in vivo.13052

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.01.2025. После доработки 07.03.2025. Принята к публикации 26.03.2025.