

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ПРЕІМПЛАНТАЦІЙНОГО ГЕНЕТИЧНОГО ТЕСТУВАННЯ НА АНЕУПЛОЇДІЇ ПРИ ВИКОРИСТАННІ ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ЗАПЛІДНЕННЯ У ПАЦІЄНТОК СТАРШОГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВІКУ

Проф. М. Г. ГРИЩЕНКО, А. С. ЛУЦЬКИЙ, доц. В. Ю. ПАРАЦУК,
канд. біол. наук О. І. ПРАВДЮК, канд. біол. наук О. В. ІГНАТОВ

Харківський національний медичний університет, Україна

Визначено частоту анеуплоїдії у різних вікових групах пацієнток і оцінено ефективність проведення преімплантаційного генетичного тестування (ПГТ-А) у програмах допоміжних репродуктивних технологій у жінок старшого репродуктивного віку. Показано, що частота отримання анеуплоїдних ембріонів прогресивно зменшується з віком жінки, однак це не впливало на їхню здатність імплантуватись. Відзначено, що частота імплантації й розвитку вагітностей були вище при проведенні ПГТ-А.

Ключові слова: преімплантаційне генетичне тестування, дослідження хромосомних порушень ембріонів, старший репродуктивний вік.

Преімплантаційне генетичне тестування (ПГТ) є методом виявлення ембріонів, що мають генні або хромосомні аномалії [1]. Подальше перенесення ембріонів без генних чи хромосомних аномалій дає змогу: запобігти народженню дитини з генетичними захворюваннями, знизити рівень репродуктивних втрат під час вагітності, а також підвищити ефективність циклів допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) [2].

Генетичну патологію ембріонів поділяють на дві основні групи: хромосомні аномалії, що зачіпають зміни на рівні хромосом, та генну патологію, що пов'язана з мутацією окремих генів [3].

Близько 70% ембріонів (як у випадку природної вагітності, так і при ДРТ) не дають народження дитини через невиношування вагітності або порушення процесу імплантації [4]. Основною причиною цього є хромосомні аномалії (анеуплоїдії), що виявляються як втрата додаткової хромосоми або її частини [5].

Найчастіше причиною виникнення хромосомних аномалій є нерозходження хромосом у процесі дозрівання статевих клітин. Причому у 85% випадків анеуплоїдії пов'язані з порушеннями під час оогенезу і лише у 15% — зі сперматогенезом [6]. Більш рідкісними причинами є успадкування батьківської хромосомної патології та порушення у процесі дроблення зиготи [7].

При проведенні екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) перші етапи життя ембріону відбуваються *in vitro* (поза організмом матері), тому є можливість дослідити хромосоми. Це дає змогу відібрати для переносу в порожнину матки ембріони з нормальним хромосомним набором, що, у свою чергу, суттєво підвищить шанси настання здорової вагітності [8].

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

— дослідження полярних тілець — редукційних клітинних утворень, які виникають при дозріванні яйцеклітини. Вони не відіграють ніякої ролі у подальшому розвитку ембріона і можуть бути вилучені без пошкодження яйцеклітини. Їх тестування дає непряму інформацію про хромосомний набір яйцеклітини, але не є гарантією її нормальності і вже, тим більше, не характеризує майбутній ембріон [9];

— дослідження бластомера — клітини ембріона на третю добу його розвитку (6–8-клітинна стадія). У цей час клітини ембріона не диференційовані і тому можливим є вилучення одного чи двох бластомерів. Генетичний аналіз вилучених бластомерів характеризує вже ембріон, але не виключає можливості його мозаїцизму [10]. Крім того, у низці досліджень було показано, що біопсія бластомера на третю добу, на жаль, призводить до погіршення імплантаційного потенціалу ембріонів [11], тому цей підхід втрачає актуальність для клінічної практики;

— дослідження клітин трофектодерми — клітин ембріонального походження, що створюють зовнішню оболонку ембріона. З усіх наведених цей підхід є найбільш інформативним і враховує можливість мозаїцизму. Біопсія трофектодерми дає змогу використовувати для діагностики кілька клітин, що різко підвищує ймовірність отримання молекулярно-генетичного висновку про тестований ембріон. Отримання клітин трофектодерми шляхом біопсії (рис. 1) передбачає культивування ембріонів до 5–7-ї доби, а також кріоконсервування останніх на період аналізу. За результатами тес-



Рис. 1. Проведення біопсії ембріона

тування кріоконсервовані ембріони можуть бути використані в подальшому у кріоциклах ДРТ [12]. Дослідження свідчать про те, що проведення біопсії трофектодерми ембріона не спричиняє негативно впливу на його подальший розвиток [13, 14].

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

- полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), причому виключно у випадках носійства моногенної патології: муковісцидозу, фенілкетонурії, спінальної м'язової атрофії, хореї Гентингтона тощо;
- флуоресцентної гібридизації, *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization – FISH) – діагностика виявлення анеуплоїдії та деяких структурних хромосомних перебудов. Із технічних причин цей тип діагностики дозволяє одночасно досліджувати лише обмежену кількість хромосом, зазвичай 3 чи 5. Тому при скринінгу анеуплоїдій FISH-діагностика поступається за інформативністю методам із повногеномною ампліфікацією (ПГГ, NGS);

– порівняльної геномної гібридизації (ПГГ), що виконується для повногеномного скринінгу анеуплоїдій у випадках множинних невдалих циклів ДРТ, наприклад звичного невиношування вагітності [15];

– секвенування наступного покоління, або NGS (next generation sequencing), – методу, що дає змогу отримати інформацію про кількісні порушення в усіх хромосомах (рис. 2, 3), а також про наявність точкових мутацій.

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

Причини хромосомних порушень при утворенні гамет залишаються недостатньо вивченими. Водночас до чинників таких порушень належить вік жінки, оскільки з його збільшенням підвищується ризик анеуплоїдії ооцитів. У результаті цього підвищується ймовірність народження дитини з хромосомними аномаліями, зокрема із синдромом Дауна [16]. Тому для пацієнок старшої вікової групи під час виконання ДРТ рекомендується проведення ПГГ на анеуплоїдії (ПГГ-А).

Крім цього, кількість яйцеклітин також зменшується з віком, що знижує шанси отримання ембріонів у лікувальному циклі ЕКЗ. Може вийти так, що після пункції і запліднення не залишиться ембріонів для проведення ПГГ-А [17, 18].

Анеуплоїдії також трапляються в ембріонах пацієнок молодого репродуктивного віку. У зв'язку з цим подружжя пара може проводити ПГГ-А у лікувальному циклі ЕКЗ для зниження ризику хромосомних порушень, спонтанного переривання вагітності та народження дитини без хромосомної патології [19].

Мета дослідження – визначення частоти анеуплоїдії у різних вікових групах пацієнок і оцінка

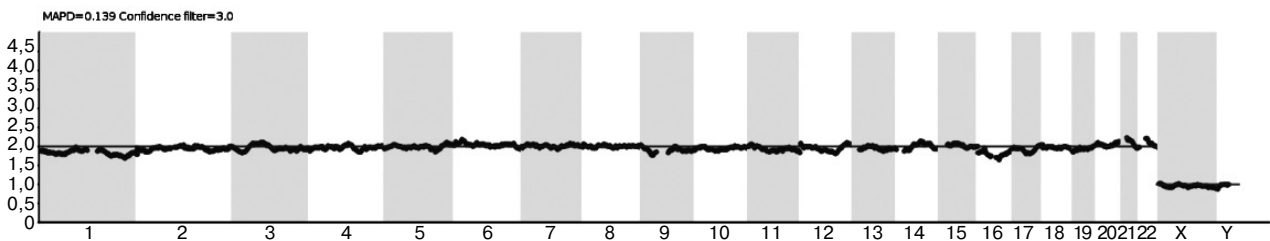


Рис. 2. Ембріон із нормальним хромосомним набором (46, XY) (результат проведення ПГГ-А методом NGS)

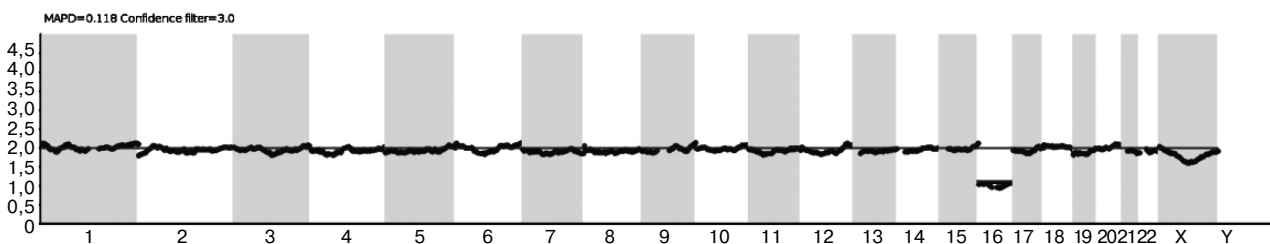


Рис. 3. Анеуплоїдний ембріон із моносомією хромосоми 16 (результат проведення ПГГ-А методом NGS)

Частота еуплоїдії і показники результативності лікування безпліддя методом екстракорпорального запліднення у різних вікових групах пацієнток із застосуванням методики порівняльної геномної гібридації на анеуплоїдії

Параметри дослідження	I група, n = 21	II група, n = 41	III група, n = 69
Кількість досліджених ембріонів	68	164	324
Кількість (частота) еуплоїдних ембріонів, %	17 (25)	72* (43,9)	179** (55,2)
Частота імплантацій, %	60	62	65
Кількість (частота) триваючих вагітностей, %	12 (57,1)	21 (51,2)	41 (59,4)

Примітка. Достовірність відмінностей із I групою з рівнем значущості * $p = 0,23$; ** $p = 0,02$.

ефективності проведення ПГТ-А у програмах ДРТ у жінок старшого репродуктивного віку.

Дослідження проведено на кафедрі акушерства та гінекології № 2 Харківського національного медичного університету в Клініці репродуктивної медицини ім. акад. В. І. Грищенка «Імплант» (м. Харків), де впроваджено технологію ПГТ-А.

На першому етапі дослідження було обстежено 131 пацієнтку, яких залежно від віку розділили на три групи і яким у протоколі ЕКЗ було проведено ПГТ-А.

У I групу увійшла 21 пацієнтка у віці 40–43 років; у II – 41 жінка віком 35–39 років; до III віднесено 69 осіб у віці від 30 до 34 років.

На другому етапі дослідження було додатково обстежено 25 жінок віком 40–43 роки, які склали IV групу та яким у протоколі ЕКЗ ПГТ-А не проводилося. Ця група обстежена для порівняльного аналізу результативності лікування безпліддя методом ЕКЗ у старшій репродуктивній групі пацієнток із застосуванням методики ПГТ-А та без неї.

Усі жінки мали регулярний менструальний цикл, нормальний яєчниковий резерв. У них раніше не було оперативних втручань на органах малого таза. За даними ультразвукового дослідження (УЗД), у всіх жінок у порожнині матки були відсутні ознаки патології ендометрію.

У зв'язку з тим, що основною причиною звернення пацієнток було безпліддя, виявлено, що первинне і вторинне безпліддя у всіх групах пацієнток траплялося з однаковою частотою. Не виявлено достовірних відмінностей в частоті визначення інших чинників безпліддя.

Жінки обстежених груп не відрізнялися за кількістю попередніх спроб ЕКЗ, тривалістю стимуляції і сумарною дозою гонадотропінів (ГТ).

Крім загальноклінічних методів дослідження, усім пацієнткам проводився ультразвуковий моніторинг (В-К Medical, Данія).

Контрольована стимуляція яєчників відбувалася з використанням антагоністів гонадотропін-релізинг гормону. Через 35 год після введення хоріонічного ГТ отримували яйцеклітини.

ПГТ-А виконувалося у програмі ЕКЗ після запліднення яйцеклітин шляхом інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда (ICSI). Біопсія трофобласту ембріонів на стадії бластоцисти виконувалася на п'ятий або шостий день культивування за допомогою мікроманіпулятора Eppendorf NK2 (Німеччина) та лазера RI Saturn 3 (Велика Британія). Отримані клітинні біоптати досліджувалися за допомогою методу NGS (секвенатор Ion S5, Thermo Fisher Scientific, США). Ембріони після біопсії кріоконсервували шляхом вітрифікації у середовищах Cryotech (Японія). За результатами ПГТ-А ембріони, що не мали анеуплоїдії, використовувалися в лікувальних циклах ДРТ.

У кожному випадку перенесення одного вітрифікованого ембріона у порожнину матки виконували під ультразвуковим контролем. Визначення рівня β -субодиниць хоріонічного гормону людини

у сироватці крові проводили через 14 дн після перенесення ембріонів із подальшим УЗД через 10 дн у разі отримання позитивного результату.

Про клінічну ефективність ЕКЗ після ПГТ-А судили за частотою настання вагітності, яку діагностували за допомогою УЗД на 21–22-й день після перенесення ембріонів.

Для статистичної обробки матеріалів дослідження використовували пакет прикладних програм Statistica 7,0 фірми StatSoft Inc. (США) для персонального комп'ютера за програмою в операційному середовищі Statistica for Windows і за прикладними програмами Excel. Достовірність відмінностей визначали за t -критерієм Стьюдента.

На першому етапі дослідження було проведено порівняльний аналіз частоти еуплоїдії та результативності ДРТ залежно від віку пацієнток при використанні ПГТ-А у циклах ЕКЗ (табл. 1).

Наші дані свідчать про те, що частота отримання еуплоїдних ембріонів прогресивно зменшується з віком жінки. Найбільший показник (55,2%) еуплоїдних ембріонів спостерігався у III групі, в якій вік пацієнток становив від 30 до 35 років, а найнижчий – у I (25%) групі з віковим періодом від 40 до 43 років. Разом із тим клінічні показники лікувальних циклів не відрізнялися суттєво між досліджуваними групами. При цьому частота імплантації та триваючих вагітностей була найвищою у пацієнток III групи (65,0 і 59,4% відповідно). Таким чином, незважаючи на те що загальна частка еуплоїдних ембріонів знижувалася з віком пацієнток, це не впливало на здатність цих еуплоїдних ембріонів імплантуватись. Той факт, що частота триваючих вагітностей в обстежених вікових групах статистично не відрізнялася, дає змогу зробити ґрунтовне припущення про те, що

Таблиця 2

Показники результативності лікувальних циклів екстракорпорального запліднення з перенесенням кріоконсервованих ембріонів у пацієнок старшого репродуктивного віку

Параметри дослідження	ПГТ-А, n = 21	Без ПГТ-А, n = 25
Частота імплантації, %	60	15,1*
Кількість (частота) триваючих вагітностей, %	12 (57,1)	5 (20,0)**

Примітка. Достовірність відмінностей із I групою з рівнем значущості * $p = 0,81$; ** $p = 0,023$.

за наявності у циклі ЕКЗ із ПГТ-А еуплоїдного ембріона ймовірність настання вагітності практично не залежить від віку жінки, що відкриває нові перспективи у лікуванні безпліддя у пацієнок старшого репродуктивного віку.

На наступному етапі дослідження ми проводили порівняльний аналіз показників клінічної ефективності циклів із перенесенням кріоконсервованих ембріонів із генетичним тестуванням на анеуплоїдії або без нього у пацієнок віком 41–43 років. Ми встановили, що частота імплантації, так само як і частота триваючих вагітностей у групі пацієнок із ПГТ-А, у кілька разів є вищою порівняно з групою, де генетичний аналіз не проводився (табл. 2). Такі драматичні розбіжності у показниках ефективності лікування у цій віковій групі можуть бути інтерпретовані з урахуванням наших даних щодо частоти еуплоїдії, що були наведені у табл. 1. Суттєве зниження ефективності лікування пацієнок старшої вікової групи при використанні стандартних методів ЕКЗ швидше за все пов'язане зі зниженням частки еуплоїдних ооцитів і, відповідно, ембріонів. Коли генетичне тестування не проводиться, основним критерієм для вибору ембріона для перенесення є морфо-

логічні характеристики. Як було показано [20], морфологічні показники ембріона навіть на стадії бластоцисти слабо корелюють з його генетичним статусом. Таким чином, коли ПГТ-А не відбувається, ймовірність перенесення у порожнину матки еуплоїдного ембріона наближається до частоти еуплоїдії у цій когорті ембріонів. Запровадження ПГТ-А, завдяки якому стає можливим перенесення саме еуплоїдного ембріона, дає змогу подолати асоційоване з віком зниження ефективності ЕКЗ.

Отримані нами дані збігаються з матеріалами наукових досліджень [18]. Автори проаналізували частоту імплантації і клінічні вагітності у жінок старшого репродуктивного віку (38–41 рік). При виконанні ПГТ-А частота імплантації становила 52,8%, а без ПГТ-А – 27,6%, частота клінічних вагітностей – 54,4%, а без ПГТ-А – 43,1%.

У ході проведення дослідження ми дійшли таких висновків.

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

Частота отримання еуплоїдних ембріонів у циклах ЕКЗ відрізняється у жінок різних вікових груп та суттєво зменшується у пацієнок старшого репродуктивного віку.

При перенесенні одного еуплоїдного ембріона після ПГТ-А показники клінічної ефективності лікувальних циклів не відрізнялися у різних вікових групах.

У групі пацієнок старшого репродуктивного віку використання ПГТ-А дає змогу істотно підвищити частоту імплантації та триваючих вагітностей порівняно з циклами, де не було ПГТ-А.

Отримані результати вказують на те, що ПГТ-А доцільно проводити у жінок старшого репродуктивного віку з метою підвищення клінічної ефективності лікування в циклах ЕКЗ із селективним перенесенням одного ембріона.

Список літератури

1. Infertility and Assisted Reproduction / R. Botros, J. A. Garcia-Velasco, H. Sallah, A. Marrigiannaris. – Cambridge Academ, 2008. – 806 p.
2. Влияние качества полученных эмбрионов на исходы программ криоконсервации при сравнении методов медленного замораживания и витрификации в циклах ВРТ / А. С. Калугина, Я. Н. Кравчук, С. А. Шлыкова [и др.] // Журн. акушерства и женских болезней. – 2012. – LXI (4). – С. 48–53.
3. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters / A. E. Calogero, A. De Palma, C. Grazioso [et al.] // Hum. Reprod. – 2001. – Vol. 16. – P. 1172–1179.
4. Структура численних хромосомних порушень в преімплантационних ембріонах человека / В. Г. Артюхова, И. Н. Лебедев, О. А. Серебренникова, А. В. Светлаков // Генетика человека и патология. – 2017. – Вып. 7. – С. 69–85.
5. A new approach to chromosomal abnormalities in sperm from patients with oligoasthenoatozoospermia: detection of double aneuploidy in addition to single aneuploidy and diploidy by five-color fluorescence in situ hybridization using one probe set / H. G. Durakbasi-Dursun, A. G. Zamani, K. C. Ruhusen [et al.] // Fertil. Steril. – 2008. – Vol. 89 (6). – P. 1709–1717.
6. A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia / R. H. Martin, A. W. Rademaker, C. Greene [et al.] // Biol. Reprod. – 2003. – Vol. 69. – P. 535–539.
7. The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? / J. D. M. Nicopoulos, C. Gilling-Smith, P. A. Almeida [et al.] // Hum. Reprod. – 2008. – Vol. 23. – P. 240–250.
8. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI

- outcome / C. Rubio, M. Gil-Salom, C. Simon [et al.] // Hum. Reprod.— 2001.— Vol. 16.— P. 2084–2092.
9. *Brown R.* The clinical benefit and safety of current and future assisted reproductive technology / R. Brown, J. Harper // Reproductive Biomedicine Online.— 2012.— Vol. 25.— P. 108–117.
 10. Полногеномная амплификация ДНК: современные достижения и перспективы использования в преимплантационной генетической диагностике / И. Я. Лебедев, А. Д. Черемных, С. А. Назаренко, А. В. Светлаков // Проблемы репродукции.— 2015.— Т. 2, № 9/10.— С. 58–65.
 11. Prognostic value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis over PGD / M. Sanchez-Castro, A. R. Jimenez-Macedo, M. Sandalinas, J. Blanco // Hum. Reprod.— 2009.— Vol. 24 (6).— P. 1516–1521.
 12. Blastomere biopsy for PGD delays embryo compaction and blastulation: a time-lapse microscopic analysis / L. Bar-El, Y. Kalma, M. Malcov [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet.— 2016.— Vol. 33 (11).— P. 1449–1457.
 13. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs / S. Mastenbroek, M. Twisk, F. van der Veen, S. Repping // Human Reprod. Update.— 2011.— Vol. 17.— P. 454.
 14. *Van de Velde H.* The experience of two European preimplantation genetic diagnosis centres on human leukocyte antigen typing / H. Van de Velde, M. De Rycke, C. De Man // Hum. Reprod.— 2009.— Vol. 24.— P. 732–740.
 15. Analysis of chromosomal abnormalities and structural changes of placenta with placenta after the use of assisted reproductive technologies / N. V. Aleksandrova, E. A. Dubova, O. A. Doronina, A. I. Shchegolev // Bulletin of Peoples Friendship University of Russia. Series «Medicine. Obstetrics and Gynecology».— 2012.— Vol. 5.— P. 96–103.
 16. FISH studies of chromosome abnormalities in germ cells and its relevance in reproductive counseling / Z. Sarate, J. Blanco, E. Anton [et al.] // Asian J. Androl.— 2005.— Vol. 7.— P. 227–236.
 17. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men / W. Vegetti, E. Van Assche, A. Frias [et al.] // Hum. Reprod.— 2000.— Vol. 15.— P. 351–365.
 18. *Schoolcraft W. B.* Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage / W. B. Schoolcraft, E. Fragouli, J. Stevens // Fertil. Steril.— 2010.— Vol. 94.— P. 1700–1706.
 19. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping cross-overs between parental haplotypes / F. Y. Handyside, G. L. Harton, B. Mariani [et al.] // J. Med. Genet.— 2009.— Vol. 25.— P. 651–658.
 20. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study / C. Rubio, J. Bellver, L. Rodrigo [et al.] // Fertil. Steril.— 2017.— Vol. 107.— P. 1122–1129.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ НА АНЕУПЛОИДИИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ПАЦИЕНТОК СТАРШЕГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

Н. Г. ГРИЩЕНКО, А. С. ЛУЦКИЙ, В. Ю. ПАРАЩУК, А. И. ПРАВДЮК, А. В. ИГНАТОВ

Определена частота анеуплоидии в разных возрастных группах пациенток и оценена эффективность проведения преимплантационного генетического тестирования (ПГТ-А) в программах вспомогательных репродуктивных технологий у женщин старшего репродуктивного возраста. Показано, что частота получения анеуплоидных эмбрионов прогрессивно уменьшается с возрастом женщин, но это не влияло на их способность имплантироваться. Отмечено, что частота имплантации и развития беременностей были выше при проведении ПГТ-А.

Ключевые слова: преимплантационное генетическое тестирование, исследование хромосомных нарушений эмбрионов, старший репродуктивный возраст.

EFFICACY ASSESSMENT OF PREIMPLANTATION GENETIC TESTING FOR ANEUPLOIDY IN PATIENTS OF INCREASED REPRODUCTIVE AGE AT IVF

М. Н. HRYSHCHENKO, А. S. LUTSKYI, V. Yu. PARASHCHUK, O. I. PRAVDIUK, O. V. IHNATOV

The frequency of aneuploidy was determined in different age groups of patients; efficacy of preimplantation genetic testing (PGT-A) in programs of in vitro fertilization in women of increased reproductive age was assessed. It was shown that incidence of aneuploidy embryos progressively decreased with the age, but this did not affect the ability to implant them. Importantly, implantation rates and incidence of pregnancy development were found to be higher in the group where PGT-A was used.

Key words: preimplantation genetic testing, investigation of chromosomal disorders of embryos, increased reproductive age.

Надійшла 22.08.2018