

## АНАЛИЗ СВЯЗИ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЖЕНЩИН И ПОЛУЧЕННЫХ ОТ НИХ ЭМБРИОНОВ В ПРОГРАММАХ ВРТ

По данным мировой литературы известно, что степень ответа женщины на стимуляцию овуляции яичников, полученное количество ооцитов, морфологические и генетические характеристики эмбрионов, полученных в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), зависят от множества факторов [1, 2]. Поскольку ответ на стимуляцию овуляции яичников является мультифакториальным признаком, представляет важность анализ вклада и генетического, и средового компонентов в развитие признака в каждой конкретной популяции. Результаты исследования генетических факторов представлены в отдельных работах отечественных авторов. Описаны результаты анализа полиморфных вариантов и мутаций отдельных генов, например *FMRI*, *INH61*, *NAT2*, *GSTT1*, *GSTM1*, у молодых женщин для раннего выявления риска развития преждевременной недостаточности яичников и внутрисемейного регулирования рождаемости [3, 4]. Представлен обзор литературы об анализе отдельных генов, определяющих ответ яичников на гормональную стимуляцию [5].

При подготовке к программам ЭКО очень важно проводить индивидуальный подбор тактики стимуляции овуляции яичников. По данным отечественных авторов (О.М. Борис), использование протоколов ВРТ с дифференцированным подходом к проведению контролируемой стимуляции овуляции у пациенток с хронической гиперандрогенной ановуляцией в зависимости от генотипов по генам *FSHR* и *ESR2* и предшествующим применением антиандрогена флутамида снижает уровень эстрадиола и прогестерона в день введения триггерной дозы хорионического гонадотропина человека в 1,3 раза, уменьшает число случаев синдрома гиперстимуляции яичников средней степени в 1,6 раза, не приводит к тяжелой степени этого синдрома, при этом качество полученных ооцитов и эмбрионов соответ-

ственно кумулятивному числу беременностей и родов [6].

Помимо получения оптимального числа эмбрионов, первостепенное значение имеют качество эмбрионов и количество полученных зуплоидных эмбрионов, которые задают прогноз успешности исхода всей программы ВРТ и получения беременности.

В связи с этим целью данного исследования стал анализ связи показателей ответа женщин разного возраста на стимуляцию суперовуляции и параметров эмбрионов, полученных от этих женщин в программах ВРТ.

### Материалы и методы

Сбор первичной информации и лабораторные исследования проводились на базе ООО «Медицинский центр ИГР» (г. Киев) с 2009 по 2016 г. При проведении генетического анализа использовались первичная информация о пациентах, медицинская документация, бластомеры ранних эмбрионов. Исследование нерасхождения хромосом в доимплантационных эмбрионах основано на результатах диагностики 5442 эмбрионов из 504 программ ICSI+ПГД.

Стимуляция суперовуляции проводилась по длинному лютеиновому протоколу с использованием агонистов лютеинизирующего гормон релизинг гормона (LHRH). Контроль над формированием фолликулов выполнялся на 7, 9, 11 дни цикла с использованием аппарата ультразвуковой диагностики. В среднем количество фолликулов составило 8–12 в каждом яичнике. На 12-й день цикла стимуляции пункция яичников с целью аспирации яйцеклеток. Полученные ооциты передавались в эмбриологическую лабораторию для процедуры ICSI. Материал для преимплантационного скрининга был получен на третьи сутки после оплодотворения ооцитов на стадии 8 клеток путем аспирации одной клетки (бластомера) эмбриона [7]. При проведении преимплантационной генетической диагностики (ПГД) на бластомере-

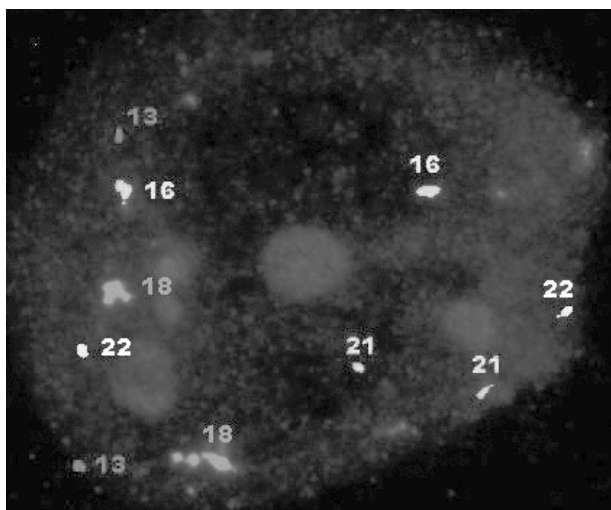
рах использовался метод FISH. После фиксации на предметном стекле наносились флуоресцентные ДНК-зонды в зону, где находились ядра клеток эмбриона. Используются зонды для хромосом 13, 16, 18, 21, 22, X, Y, исследования которых обеспечивают коммерческие наборы PB MultiVysion и CepX/CepY (производитель Abbott, США) [8]. Микроскопический анализ осуществлялся с использованием флуоресцентного микроскопа и программы автоматической обработки изображения, в данном случае программы ISIS (производство Meta Systems, Германия) [9].

Проверку распределения количественных дат на соответствие закону нормального распределения выполняли методами Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Статистический анализ дат, которые нормально распределяются, проводили параметрическими методами. Исследование связей между признаками проводилось методом корреляционного анализа по Пирсону и Спирмену [10]. Статистические гипотезы проверялись на уровнях значимости  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ .

### Результаты и обсуждение

Возраст пациенток, принимающих участие в программах ВРТ, находился в пределах от 20 до 47 лет. На одну процедуру гормональной стимуляции для получения ооцитов от разных женщин было получено от 1 до 34 эмбрионов на цикл.

Результаты исследования показали, что 1386 (25,5%) эмбрионов из 5442 проанализированных были определены как эуплоидные (рис. 1).



**Рис. 1.** Изображение интерфазного ядра бластомера с флуоресцентными метками хромосом 13, 16, 18, 21, 22, отвечающим эуплоидному набору хромосом, реагент MultiVysion PB (Abbott-Vysis, USA), увеличение  $10 \times 100$  (ориг.)

Анализ возраста пациенток в каждой группе, сформированной в соответствии количеству полученных эмбрионов, показал, что имеется обратная связь между количеством эмбрионов на цикл овариальной стимуляции и средним возрастом женщин:  $r = -0,74$  ( $p = 0,0001$ ) (рис. 2). После одной стимуляции можно ожидать большего количества эмбрионов от более молодых женщин.

Отмечается прямая связь между средним возрастом женщин в каждой исследуемой группе и долей эуплоидных эмбрионов, полученных



**Рис. 2.** Распределение показателей среднего возраста женщин в зависимости от количества эмбрионов на программу ВРТ



Рис. 3. Распределение количества зуплоидных эмбрионов у женщин разного возраста

в одном цикле овариальной стимуляции:  $r = 0,39$  ( $p = 0,026$ ).

Анализ связи между возрастом пациенток и количеством эмбрионов на цикл овариальной стимуляции показал отрицательную корреляцию между этими признаками:  $r = -0,31$  ( $p = 0,0000001$ ). Обратная связь отмечается также между возрастом пациенток и количеством зуплоидных эмбрионов на цикл овариальной стимуляции у каждой женщины:  $r = -0,29$  ( $p = 0,0000001$ ) (рис. 3). Положительная связь выявлена между количеством эмбрионов на цикл у женщин и количеством зуплоидных эмбрионов на цикл:  $r = 0,65$  ( $p = 0,0000001$ ).

Для женщин каждой возрастной группы, от 20 до 47 лет, проанализировано распределение количества эмбрионов в целом и количество зуплоидных эмбрионов на цикл овариальной

стимуляции. Выявлена отрицательная корреляция между возрастом женщин и средним числом зуплоидных эмбрионов на цикл:  $r = -0,71$  ( $p = 0,0001$ ).

### Выводы

Возрастные характеристики пациенток оказывают значительное влияние как на ответ на овариальную стимуляцию, так и на количество зуплоидных эмбрионов на цикл стимуляции. С учетом того, что 75% эмбрионов, получаемых в программах ВРТ, имеют хромосомные анеуплоидии, эффективной стратегией является назначение преимплантационного генетического скрининга парам, в которых возраст женщины является критическим, т.е. выше 36 лет, для предупреждения хромосомной патологии в доимплантационном периоде онтогенеза.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Wissing M.L., Kristensen S.G., Andersen C.Y., Mikkelsen A.L., Hóst T., Borup R., Grøndahl M.L. Identification of new ovulation-related genes in humans by comparing the transcriptome of granulosa cells before and after ovulation triggering in the same controlled ovarian stimulation cycle // *Hum. Reprod.* – 2014. – 29, № 5. – P. 997–1010.
2. von Wolff M., Kollmann Z., Flick C.E., Stute P., Marti U., Weiss B., Bersinger N.A. Gonadotrophin stimulation for *in vitro* fertilization significantly alters the hormone milieu in follicular fluid: a comparative study between natural cycle IVF and conventional IVF // *Hum. Reprod.* – 2014. – 29, № 5. – P. 1049–1057.
3. Лівшиць Г.Б., Кравченко С.А., Татарський П.Ф., Судома І.А., Лівшиць Л.А. Молекулярно-генетичне дослідження порушень природної та стимульованої овуляції // *Цитология и генетика.* – 2008. – 42, № 2. – С. 63–69.
4. Лівшиць Г.Б., Кравченко С.А., Грищенко Н.В., Судома І.А. Використання методів ДНК-аналізу для діагностики спадкових форм передчасного виснаження яєчників // *Цитология и генетика.* – 2005. – 39, № 2. – С. 59–63.
5. Веропотвелян П.Н., Веропотвелян Н.П., Бондаренко А.А. Современный взгляд на синдром преждевременной недостаточности яичников // *Мед. аспекты здор. женщины.* – 2012. – № 3/1. – С. 48–56.
6. Борис О.М. Ефективність протоколів допоміжної репродуктивної технології з диференційованим підходом щодо проведення контрольованої оваріальної стимуляції в пацієнток із хронічною гіперандрогенною ановуляцією залежно від результатів тестування на поліморфізм генів FSHR та ESR2 та з попередньою підготовкою флутамідом // *Медико-социальные проблемы семьи.* – 2012. – 17. – С. 3–4.
7. Harton G.L., Magli M.C., Lundin K., Montag M., Lemmen J., Harper J.C. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group. Best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS) // *Human Reproduction*, 2010. – 1. – P. 1–8.
8. Lichter P., Ried T. Chapter 25. Molecular analysis of chromosome aberrations in situ hybridization [Text] // *Methods in molecular biology* / J.M. Walker (ed.). – Totowa, NJ: Humana Press, 2010. – 29: Chromosome analysis protocols / J. R. Gosden (ed.). – P. 449–478.
9. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. Медицинская цитогенетика. – М., 2006. – С. 219–222.
10. Атраментова Л.О., Утевська О.М. Статистичні методи в біології. – Х.: ХНУ, 2007. – 288 с.

GONTAR J.V.<sup>1,2</sup>, LAKHNO Y.V.<sup>1,2</sup>, ILYIN I.E.<sup>1</sup>, FEDOTA O.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Medical Center IGR,

Ukraine, 03115, Kyiv, Pobedy ave., 121-B, e-mail: genetics-J@yandex.ru

<sup>2</sup> V.N. Karazin Kharkiv National University,

Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody sq., 4

## THE ANALYSIS OF THE RELATIONSHIP OF WOMEN QUANTITATIVE CHARACTERISTICS AND THEIR RECEIVED EMBRYOS IN ASSISTED REPRODUCTION PROGRAMS

**Aim.** Analysis of relationship between response rates of women of different ages on the superovulation and embryo parameters derived from these women in programs of assisted reproductive technologies. **Methods.** Research of non-disjunction chromosomes in preimplantation embryos based on the results of diagnostics of 5442 from 504 ICSI + PGD programs. Stimulation of superovulation was carried out on a long luteal protocol using agonists of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH). During the preimplantation genetic diagnosis (PGD) in the blastomeres FISH method was used. Probes for chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X, Y were used. Researching of relations between signs carried out by correlation analysis of Pearson and Spearman. **Results.** 1386 (25.5%) embryos from 5442 are defined as euploid. There is a direct correlation between the average age of women and the proportion of euploid embryos produced in one cycle of ovarian stimulation ( $r = 0.39$ ), between the number of embryos per cycle in women and the number of euploid embryos per cycle ( $r = 0.65$ ). There is an inverse relationship between the number of embryos per cycle of ovarian stimulation and middle-aged women ( $r = -0.74$ ), between the age of patients and the number of euploid embryos per cycle of ovarian stimulation ( $r = -0.29$ ), between the age of patients and the number of embryos in the ovarian cycle stimulation ( $r = -0.31$ ). **Conclusions.** Age characteristics of the patients have a significant effect on the response to ovarian stimulation, and the number of euploid embryos stimulation cycle. Given that 75% of embryos obtained in ART programs have chromosomal aneuploidy, an effective strategy is to assign pairs of preimplantation genetic screening, where a woman's age is critical for the prevention of chromosomal aberrations in the preimplantation period of ontogenesis.

**Keywords:** preimplantation genetic diagnosis, assisted reproductive technologies, aneuploid embryos, response to ovarian stimulation.