

УДК 611.013

© Колектив авторів, 2012.

## СПЕКТР КІЛЬКІСНИХ ХРОМОСОМНИХ АНОМАЛІЙ ПРЕІМПЛАНТАЦІЙНИХ ЕМБРІОНІВ ЛЮДИНИ

**О.В. Чапля, Ю.В. Гонтар, І. Є. Ільїн, Н.М. Білько**

*Центр молекулярних та клітинних досліджень Національного університету «Києво-Могилянська академія» (керівник – проф., д.мед.н. Н.М. Білько); ТОВ «Інститут генетики репродукції», директор – к.мед.н. І.Є. Ільїн), м. Київ.*

**NUMERICAL CHROMOSOMAL ABNORMALITIES OF HUMAN PREIMPLANTATION EMBRYOS**  
**O.V. Chaplia, Yu.V. Gontar, I.Ye. Ilin, N.M. Bilko**

### SUMMARY

The investigation of preimplantation embryos' chromosomal anomalies is of great interest as it can unravel the mechanisms of natural selection against aneuploidy. Genetic screening of embryos, derived from in vitro fertilization programs, showed that almost 69% of them possess numerical chromosomal abnormalities. It confirms that the most effective elimination of aneuploid embryos takes place during the earliest stages of human development.

### СПЕКТР КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА

**О.В. Чапля, Ю.В. Гонтарь, И. Е. Ильин, Н.М. Билько**

### РЕЗЮМЕ

Генетическая диагностика эмбрионов, полученных в программах оплодотворения in vitro, позволяет изучать особенности действия природного отбора против анеуплоидий. Применение технологии преимплантационного генетического скрининга показало, что около 69% преимплантационных эмбрионов имеют различные количественные хромосомные аномалии. Полученные результаты указывают, что наиболее эффективно элиминация анеуплоидных эмбрионов проходит на самых ранних этапах развития человека.

**Ключові слова: хромосомні аномалії, ембріони людини.**

Кількісні хромосомні аномалії, що можуть виникнути на будь-якому етапі раннього розвитку ембріона, виступають основними причинами порушення процесів імплантації, переривання вагітності чи вроджених вад плода. Відомо, що 4,5-7% плодів 10-12 тижнів гестації характеризуються аномаліями хромосомного набору [9]. Водночас, хромосомні аберації діагностують лише у 2-3% плодів у другому триместрі вагітності, тоді як серед новонароджених кількісні та структурні аберації хромосом зустрічаються лише у 0,6-0,7% випадків [8]. Подібна закономірність дозволяє припустити існування строгого природного добору, що діє проти патологічних ембріонів протягом їх розвитку. Подібний механізм елімінації патологічних ембріонів, вірогідно, відіграє ключову роль у відносно зниженій фертильності людини та є причиною неуспішного застосування допоміжних репродуктивних технологій [1].

Особливо важливим для встановлення закономірностей онтогенезу патологічних ембріонів є дослідження частоти хромосомних аномалій серед преимплантаційних ембріонів, що тривалий час було неможливим у зв'язку із обмеженнями технічного та етичного характеру. Втім, впровадження у широку практику технології запліднення in vitro та мікроманіпуляцій із окремими клітинами дозволили розробити методику преимплантаційного генетичного скринінгу, що передбачає аналіз

кількості певних хромосом у ембріонів ще до моменту імплантації останніх у порожнині матки. Хромосомний аналіз преимплантаційних ембріонів, отриманих у циклах запліднення in vitro показав, що близько 60% зразків на стадії дроблення містять щонайменше одну клітину із анеуплоїдним набором хромосом [7]. Дослідження, проведені із використанням порівняльної геномної гібридизації продемонстрували, що серед ембріонів, отриманих у циклах запліднення in vitro, лише 25% мають нормальний каріотип, 51% є регулярно анеуплоїдними і 24% містять як анеуплоїдні, так і еуплоїдні клітини [10].

Для встановлення закономірностей дії добору проти анеуплоїдних ембріонів особливо важливим є дослідження спектру хромосомної аномалії на найбільш ранніх, доімплантаційних етапах розвитку ембріонів, що і було метою даної роботи.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У період із червня 2010 по грудень 2011 рр. був проведений преимплантаційний скринінг хромосомних аномалій ембріонів, отриманих у 55-и циклах запліднення in vitro для 47-и безплідних пар, що не мали доведених репродуктивних ризиків. Загалом було отримано 612 зрілих ооцитів, 549 з яких були успішно запліднені методом інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда до

цитоплазми ооцита (коефіцієнт запліднення становив 89,7%). Культивування ембріонів проводили у мікрокраплях середовищ MediCult (Данія) протягом п'яти днів, до моменту перенесення до порожнини матки ембріонів, що за результатами проведеного генетичного дослідження були визнані нормальними.

Біопсію бластомера для проведення преімплантаційного скринінгу проводили на третій день розвитку ембріону, оскільки на даному етапі ембріональні клітини є тотипотентними і здатні компенсувати втрату однієї клітини активнішим поділом [7]. При цьому, після обробки гіпотонічним розчином (0,6 % БСА, 1 % цитрат натрію), ядро вилученого бластомера обробляли фіксатором Карнуа. Дослідження кількості статевих хромосом та гомологів 13-ї, 16-ї, 18-ї, 21-ї, 22-ї пар аутосом у фіксованому матеріалі проводили методом флюоресцентної *in situ* гібридизації із використанням комерційного набору PB Multivysion Panel та суміші зондів на статеві хромосом CEPX/CEPY (Vysis Abbot, США). Зразки денатурували 8 хв при 69°C, після чого інкубували протягом 4 год у вологій камері за температури 37°C. Постгібридизаційна обробка включала промивку у 0,7xSSC/0,4% NP-40 при 73°C (7 хв) та 2xSSC/0,1% NP-40 при кімнатній температурі. Аналіз сигналів проводили із використанням одинарних фільтрів (Aqua, Blue, Green, Yellow, Red, Olympus, США) [2].

Біопсії бластомера на третій день культивування підлягали 466 ембріонів (84,8 % отриманих зразків), інші зупинилися у розвитку до моменту проведення процедури. Результати скринінгу було отримано у 417 випадках, тобто в середньому для 7,6 ембріонів/цикл діагностики. Таким чином, успішність процедури становила 89,5 %, а причинами невдач виступали: відсутність (n=12) чи фрагментованість ядра вилученого бластомера (n=11), що стала на заваді встановленню істинних кількісних характеристик хромосом ембріона, чи порушення процесів гібридизації зондів із генетичним матеріалом (n=37).

Процедура преімплантаційного генетичного скринінгу за інформованої згоди пацієнтів призначалася за строгими показаннями [2]:

1) Старший репродуктивний вік жінок (понад 35 років);

2) Звичне невиношування, що передбачає 2 чи більше самовільних переривання вагітності (особливо у випадку доведеної хромосомної патології абортусів);

3) Численні невдалі програми запліднення *in vitro*, що завершувалися переносом до порожнини матки ембріонів високої якості без настання вагітності (за умови проведення e<sup>3</sup>3 ембріотрансферів чи сукупного перенесення до порожнини матки понад 10-и ембріонів).

Всім подружжям, включеним до циклів лікування із застосуванням преімплантаційного генетичного

скринінгу, проводилося каріотипування лімфоцитів периферійної крові; ніяких аномалій каріотипу при цьому виявлено не було.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За результатами проведеного дослідження дві копії хромосом інтересу несли лише 33,1% обстежених ембріонів (138 зразків), що становило в середньому 2,5 еуплоїдних ембріонів на кожен цикл діагностики. Переважна більшість (68,9 %) ембріонів мали кількісні аберації хромосом, що включали: порушення рівня плоїдності (21,9 %), ізольовані полісомії (15,4 %) чи моносомії (16,1%) та комплексні аномалії хромосомного набору (46,6 % патологічних зразків).

Дані стосовно індивідуального розподілу ізольованих та комбінованих анеуплоїдій проаналізованих аутосом представлені у таблиці 1. Так, найвагомішу частину ізольованих полісомій становили кількісні аберації хромосоми 21, отже, дана патологія превалює як на постнатальному, так і на преімплантаційному етапі розвитку. Найбільшу частку серед ізольованих моносомій становила втрата одного із гомологів 16-ї пари аутосом. Дана аномалія грубо порушує процеси морфогенезу і перешкоджає імплантації патологічних ембріонів у порожнині матки [6].

До хромосом, найбільш задіяних у комплексній патології, належали хромосоми 13-ї та 22-ї пар, однак варто відмітити, однак слід відмітити, що кількісні відхилення даних хромосом мали різний характер. Так, набуття додаткової хромосоми 13 складало 40 % всіх полісомій у складі комплексної патології, тоді як внесок хромосоми 22 був зумовлений значною кількістю (30 %) ембріонів, що втратили гомолог даної хромосоми.

Деякі автори [4] припускають, що спектр хромосомної патології новонароджених формується передусім за рахунок відмінностей між частотами виникнення аномалій окремих аутосом. Однак, проведений аналіз частоти аберацій окремих хромосом дозволив спростувати факт підвищеної вірогідності виникнення певних анеуплоїдій протягом формування та перших етапів розвитку ембріона. Так, внесок загальної частоти кількісних аберацій кожної із проаналізованих аутосом у формування хромосомної патології преімплантаційних ембріонів суттєво не відрізнявся і варіював у межах 19-21 % (рис.1). Вірогідно, спектр хромосомних аномалій формується за рахунок вибіркової елімінації ембріонів із певними генетичними порушеннями, оскільки їх фізіологічні характеристики значно відрізняються від показників нормальних клітинних ліній. Так, молекулярно-генетичні дослідження ліній стовбурових клітин, отриманих із генетично аномальних ембріонів, виявили, що паттерн експресії клітин із трисомією хромосоми 21 ближчий за всі інші до контрольного профілю [3].

Таблиця 1

Кількість ембріонів, у яких були виявлені кількісні аномалії окремих хромосом

Типи кількісних абераций окремих хромосом	Кількість та відносна частка ембріонів із анеуплоїдіями хромосоми					Загальна кількість аномальних ембріонів
	13	16	18	21	22	
Ізольована полісомія	8 (20,5%)	6 (15,4%)	8 (20,5%)	12 (30,8%)	5 (12,8%)	39
Ізольована моносомія	7 (17,0%)	11 (26,8%)	8 (19,5%)	8 (19,5%)	7 (17,0%)	41
Полісомія хромосоми як частина комплексної патології	39 (30,0%)	14 (10,8%)	25 (19,2%)	22 (15,8%)	28 (20,1%)	130
Моносомія хромосоми як частина комплексної патології	26 (20,0%)	45 (34,6%)	31 (23,8%)	29 (22,3%)	39 (30,0%)	

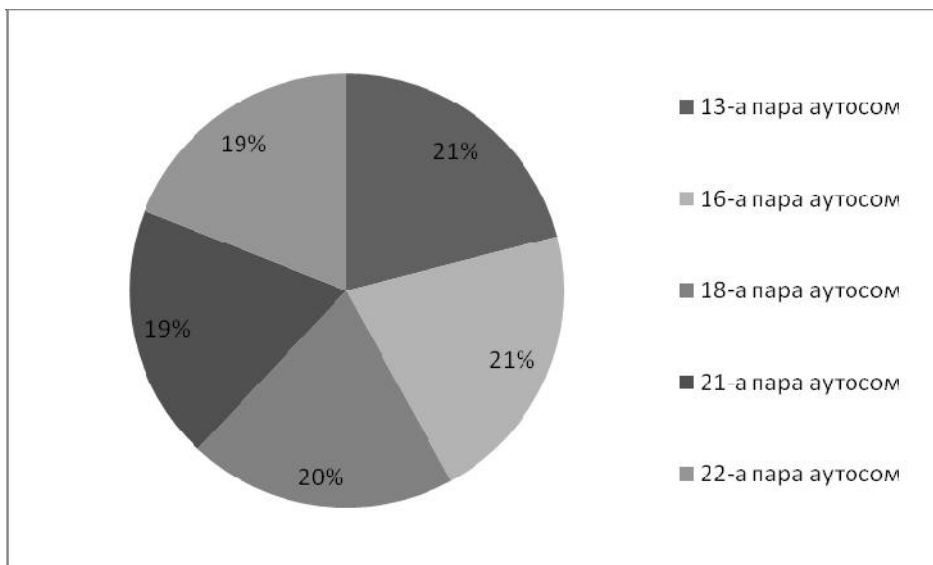


Рис.1. Розподіл загальних частот анеуплоїдій окремих аутосом, виявлених при проведенні преімплантаційного генетичного скринінгу.

Співвідношення ембріонів чоловічої та жіночої статі у загальній когорті становило 0,455:0,545 (стать ембріона визначали за присутністю сигналу хромосоми Y незалежно від кількості копій статевої хромосоми X), тоді як статевий розподіл еуплоїдних ембріонів становив 0,485:0,515 (XX:XY відповідно), що співвідноситься з теоретичними розрахунками [5]. Анеуплоїдії статевої хромосоми зустрічалися у 14,2 % і були представлені як втраатою (X<sub>-</sub>, Y), так і набуттям додаткових копій однієї із статевої хромосоми (XXX, XXY, XYY, XXYY). При цьому моносомія статевої хромосоми X зустрічалася найбільш часто (24 ембріона), що зумовило превалювання жіночої статі у загальній когорті зразків. Варто зазначити, що

ізольовані аберації статевої хромосоми були характерні лише 7 ембріонам, у інших випадках подібні відхилення поєднувалися із аномаліями аутосом.

#### ВИСНОВКИ

1. Аномалії хромосомного набору за хромосомами 13, 16, 18, 21, 22, X та Y були характерні 69 % преімплантаційних ембріонів, що значно перевищує частоту виявлення анеуплоїдій на пренатальному етапі розвитку.

2. Від моменту утворення зиготи до моменту народження дитини спостерігається чітко виражена тенденція до зменшення частки ембріонів із порушеннями хромосомного набору; при цьому

найбільш ефективно добір проти ембріонів із хромосомними патологіями реалізується на преімплантаційному етапі їх розвитку.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Delhanty J. D. A. Preimplantation genetics: an explanation for poor human fertility? // *Annals of human genetics*. – 2001. – Vol.65. – P.331-338.

2. ESHRE PGD Consortium ‘Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)’ // A. R. Thornhill [et al.] // *Human reproduction*. – 2005. – Vol.1. – P.35-48.

3. Human embryonic stem cells as models for aneuploid chromosomal syndromes / J.-C. Biancotti [et al.] // “*Stem cells*. – 2010. – Vol. 28. – P.1530–1540.

4. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study / J. Menasha [et al.] // *Genetics in medicine*. – 2005. – Vol.7, №4. – P. 251-263.

5. Karyotyping, congenital anomalies and follow-up of children after intracytoplasmic sperm injection with non-ejaculated sperm: a systematic review / G.H.

Woldringh [et al.] // *Human reproduction update*. – 2010. – Vol. 16, №1. – P.12-19.

6. Lebedev I. N. Characteristics of phenotypic expression of autosomal monosomies during pathological postimplantation human development / I. N. Lebedev, S. A. Nazarenko // *Ontogenez*. – 2004. – Vol.35, №1. – P. 53-60.

7. Mantzouratou A. Variable aneuploidy mechanisms in embryos from couples with poor reproductive histories undergoing preimplantation genetic screening / A. Mantzouratou, A. Mania1, E. Fragouli // *Human reproduction*. – 2007. – Vol.22, №7. – P.1844-1853.

8. Nielsen J. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark / J. Nielsen, M. Wohlert // *Human genetics*. – 1991. – Vol.87, №1. – P.81-83.

9. Spencer K. Aneuploidy screening in the first trimester // *American journal of medical genetics*. – 2007. – Vol.145C. – P. 18-32.

10. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? Experience with blastocyst biopsy and testing for aneuploidy / R. P. S. Jansen [et al.] // *Human reproduction*. – 2008. – Vol.23, №7. – P. 1476-1478.