

ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ В ЦИКЛАХ ЭКО/ЭКО-ИКСИ

В.Н. Локиин, В.В. Ладыгина, В.В. Чистяков, А.Е. Чистякова

Приводится анализ результатов преимплантационной диагностики эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий, проведенных с начала 2009 года по настоящее время в лаборатории клинической генетики Института репродуктивной медицины.

Ключевые слова: преимплантационный генетический скрининг.

Современные достижения в области репродуктивной медицины дают шанс на наступление беременности и рождение ребенка у супружеских пар, страдающих различными формами бесплодия. Нередко причиной бесплодия являются генетические нарушения. При применении программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) у данной группы пациентов возникает риск передачи хромосомных или генных патологий будущему потомству. Хромосомные нарушения занимают большой процент среди причин невынашивания индуцированной беременности. В настоящее время доказано, что частота пороков развития у детей, родившихся в результате программы ИКСИ выше, чем в популяции. Многие литературные источники указывают на взаимосвязь между патоспермией и повышенным уровнем анеуплоидий в ядрах сперматозоидов, что может приводить к развитию анеуплоидных эмбрионов [1–5]. Данный факт делает необходимой оптимизацию программы ЭКО-ИКСИ с разработкой и применением новых профилактических мер [6, 7]. С применением методов ВРТ стало возможным наступление беременности у пациенток старшего репродуктивного возраста. Но следует отметить,

что существует прямая зависимость хромосомных патологий плода от возраста матери [8].

По данным Ватт с соавт. по результатам нескольких ЭКО-центров процент имплантации в возрастной группе от 35 до 42 лет уменьшается на 30–50 % по сравнению с группой пациентов 25–34 лет. Авторы связывают данный факт с возрастанием уровня анеуплоидий в эмбрионах возрастных женщин и ожидают увеличение имплантации в данной группе пациентов после применения преимплантационной генетической диагностики [9]. В связи с этим все большее значение приобретает проведение преимплантационной генетической диагностики в программах ВРТ. В 2008 г. на базе лаборатории клинической генетики Института репродуктивной медицины была внедрена преимплантационная генетическая диагностика (ПГД) методом FISH (Fluorescence In Situ Hybridization).

Целью настоящего исследования явился анализ результатов преимплантационной диагностики эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий, проведенных с начала 2009 г. по настоящее время в лаборатории клинической генетики Института репродуктивной медицины.

Частота встречаемости анеуплоидий в эмбрионах

Патология	Частота встречаемости в популяции	Кол-во эмбрионов с данной патологией	
		абс.	%
Моносомия по X хромосоме (синдром Шерешевского–Тернера)	0,1–0,4/1000	5	17
Дисомия по X хромосоме при мужском кариотипе (синдром Клайнфельтера)	1,2/1000	5	17
Трисомия по X хромосоме	0,65/1000	3	10,3
Дисомия по Y хромосоме	1,5/1000	2	6,8
Трисомия по 13 хромосоме (синдром Патау)	1/6000–13000	1	3,4
Трисомия по 18 хромосоме (синдром Эдварса)	1/7000	1	3,4
Трисомия по 21 хромосоме (синдром Дауна)	1/800–1000	1	3,4
Моносомия по всем исследованным хромосомам	-	7	24
Трисомия по всем исследованным хромосомам	-	1	3,4
Трисомия по 18 и 21 хр. + дисомия по Y	-	1	3,4
Моносомия по 21 хромосоме	-	2	6,8

Материалы и методы. Преимплантационная генетическая диагностика была проведена в 20 циклах ЭКО за период с января по октябрь 2009 г. Для культивирования эмбрионов использовали среды EmbryoAssist и BlastAssist (Medicult). Материалом для исследования служили ядра бластомеров. Биопсию осуществляли на третьи сутки развития эмбрионов *in vitro*. Пригодными для исследования считались эмбрионы высокого морфологического качества, состоящие из 6–10 бластомеров, с фрагментацией не более 25 %. Биопсию проводили на микроманипуляторе NARISHIGE с использованием микропипеток фирмы HUMAGEN. Забор бластомеров осуществляли после проведения двойного механического хетчинга.

Подготовку и фиксацию ядер проводили по методике, рекомендованной специалистами Kaplan Medical Center (Израиль). Для флуоресцентной гибридизации *in situ* использовали реактивы фирмы Vysis. Исследования проводили по пяти хромосомам (13, 18, 21, X, Y). Интерпретацию гибридных сигналов проводили по критериям, предложенным Munne et al., 1998, на микроскопе OLYMPUS BX 61 с флуоресцентным источником питания с программным обеспечением Applied Imaging.

Результаты и их обсуждение. Из 20 проведенных циклов ЭКО-ПГД в 16 использовали собственные ооциты и в 4 – донорские клетки. Средний возраст женщин составил 32,9 и 26,5 лет соответственно. На третьи сутки 42,6 % эмбрионов были пригодны к биопсии. Всего было исследовано 58 эмбрионов, что составило 32,5 %

от общего числа и 76,3 % от числа пробиопсированных. Генетический скрининг анеуплоидий показал, что 29 эмбрионов (50 %) имели нормальный набор по исследуемым хромосомам, и в 29 эмбрионах (50 %) были выявлены различные хромосомные нарушения. Частота встречаемости анеуплоидий в исследованных эмбрионах, представлена в таблице.

На пятые сутки из 29 нормальных эмбрионов 17 были перенесены в полость матки и 6 криоконсервированы на стадии бластоцисты. Процент созревания бластоцист составил 79 % от числа нормальных исследованных эмбрионов. Остановка развития наблюдалась у 6 эмбрионов (21 %). В группе с выявленной патологией на пятые сутки 16 из 29 эмбрионов имели стадию развития, соответствующую норме, что составило 55 % и 13 эмбрионов с хромосомными нарушениями остановились в развитии (45 %). Данный факт свидетельствует о том, что высокая морфологическая оценка эмбриона не является показателем его генетического “здоровья”. Клинический случай, описанный ниже, является подтверждением сказанного.

В анамнезе у супружеской пары прерывание беременности на сроке 22–24 недели по медицинским показаниям (кариотип плода 47XX +mar). Возраст супруги – 22 г., возраст супруга – 52 г. Проведена программа ЭКО-ПГД, в результате которой получено 32 ооцита, 23 с нормальным оплодотворением. На третьи сутки пробиопсировано девять эмбрионов высокого качества, по семи из которых получен результат преимплантационной генетической диагностики. На первом

этапе исследования обнаружены три эмбриона с нормальным набором X, Y и 18 хромосом. После регбридизации и нанесения флуоресцентной пробы на 13 и 21 хромосомы, в двух из трех эмбрионов обнаружены трисомии по данным хромосомам. На пятые сутки оба эмбриона с выявленной анеуплоидией достигли стадии бластоцисты и имели высокую морфологическую оценку. По результатам ПГД был осуществлен перенос одного исследованного эмбриона.

В результате проведенных 20 циклов ЭКО-ПГД, 13 из них закончились переносом исследованных эмбрионов (в среднем на цикл 1–2 эмбриона). Еще в двух циклах помимо переноса была произведена криоконсервация бластоцист. В четырех программах эмбриоперенос был отменен по причине отсутствия эмбрионов с нормальным набором исследованных хромосом. В данную группу вошли пациенты старше 38 лет, а также супружеская пара с тяжелой формой мужского бесплодия. Анализ данных программ подтверждает литературные данные о влиянии возрастного фактора и сочетанных форм патоспермии на уровень анеуплоидий в эмбрионах (5–6). В двух циклах состоялся перенос неисследованных эмбрионов. Беременность наступила у четырех женщин. Эффективность программы составила 26,7 % на перенос. В настоящий момент успешно развиваются четыре беременности. Результат ПГД подтвержден данными ультразвукового исследования и пренатальной диагностики. Первые роды ожидаются в первой декаде ноября 2009 года.

Выводы

1. Анализ результатов ПГД позволяет сделать вывод о том, что биопсия blastomera, выполненная на эмбрионе высокого качества, не влияет на его дальнейшее развитие, что подтверждено высоким выходом бластоцист после биопсии.

2. Проведенные исследования с применением ПГД показывают высокий процент формирования бластоцист из эмбрионов с анеуплоидией, что указывает на отсутствие корреляции между морфологической и генетической оценками эмбриона.

3. В группе пациентов старшего репродуктивного возраста, а также у супружеских пар с мужским фактором бесплодия наблюдается высокий процент анеуплоидных эмбрионов.

Проведенное нами исследование безусловно подтвердило важность широкого применения преимплантационной диагностики при проведе-

нии программ ВРТ в группе риска хромосомной патологии и при предшествующих неудачных программах ВРТ.

Литература

1. Centola G., Eberly S. Seasonal variations and age-related changes in human sperm count, motility, motion parameters, morphology, and white blood cell concentration // *Fertil Steril.* 1999 Nov; 72(5):803–8.
2. Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А. Электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов как функциональный тест спермиологического обследования. М., 2002.
3. Evenson, D.P. Alterations and damage of sperm chromatin structure and early embryonic failure. In Jansen. R. and Mortimer, D. (eds), *Towards Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond 1999.* Parthenon Publishing Group, New York, pp. 313–329. 1999.
4. Zini Libman A. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction // *Can. Med. Assoc. J.*, August 29, 2006; 175(5): 495–500.
5. Findikli N., Kahraman S., Kumtepe Y. Assessment of DNA fragmentation and aneuploidy on poor quality human embryos. *Reprod Biomed Online* 2004; 8, 2: 196–206.
6. Глинкина Ж.И. Преимплантационная генетическая диагностика врожденных и наследственных заболеваний методом FISH в программе ЭКО и ПЭ / Ж.И. Глинкина, Б.В. Леонов, В.А. Бахарев, В.А. Лукин // *Вспомогательные репродуктивные технологии в лечении женского и мужского бесплодия*; под ред. В.И. Кулакова, Б.В. Леонова. М., 2005. С. 162–175.
7. Глинкина Ж.И. Комплексное генетическое обследование мужчин программы ИКСИ / Ж.И. Глинкина // *Гинекология.* 2006. Т. 8. № 4. С. 60–63.
8. Munné, S., Magli C., Cohen J., Morton P., Sadowy S., Gianaroli L., Tucker M., Marquez C., Sable D., Ferraretti A.P. et al. (1999). Positive outcome after preimplantation diagnosis of human embryos. *Hum Reprod* 14, 2191–2199.
9. Santiago Munné, Cristina Magli, Jacques Cohen, Paula Morton, Sasha Sadowy, Luca Gianaroli, Michael Tucker, Carmen Márquez, David Sable, Anna Pia Ferraretti, Joe B. Massey and Richard Scott. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos *Human Reproduction*, Vol. 14, No. 9, 2191–2199, September 1999.