

**УДК** 576.3/7.086.83:611 – 018.4 – 083**СЕЛЕКТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ОСТЕОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ IN VITRO****Буше В.В.**

**Резюме.** Разработана упрощенная технология получения остеогенных клеток в зависимости от расположения костных фрагментов на коллагеновой подложке. Клеточные линии периоста и эндоста могут быть успешно выделены, размножены в культуре и использованы.

**Ключевые слова:** культивирование, клетки периоста, клетки эндоста.

**UDC** 576.3/7.086.83:611 – 018.4 – 083**The OSTEOGENOUS CELLS LINE SELECTIVE PRODUCTION IN VITRO****Bushe V.V.**

**Summary.** The simplified method of getting osteogenous cells depending on bone fragment location on the collagen substrate was developed. Cell lines of periosteum and endosteum can be isolated, replicated and used successfully.

**Key words:** cultivation, periosteum cells, endosteum cells.

Стаття надійшла 10.02.2011 р.

**УДК** 573.6:577.21-076**А.М. Феськов, И.А. Феськова, Е.С. Жилкова, В.В. Грабарь, Е.В. Блажко****ПРЕИМПЛАНТАЦИОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА  
ЭМБРИОНОВ ПАЦИЕНТОВ С НАЛИЧИЕМ ХРОСОМНЫХ  
АНЕУПОЛОИДИЙ В ЯДРАХ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПО ХРОСОМОМ  
X, Y, 18****Центр репродукции человека «Клиника профессора Феськова А.М.» (г. Харьков)**

**Вступление.** Проведение преимплантационной генетической диагностики (ПГД) анеуплоидий эмбрионов методом FISH в ходе выполнения программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) позволяет повысить шансы рождения здорового ЭКО-ребенка. Показаниями для проведения ПГД являются возраст пациента, отягощенный анамнез, неудачные попытки ЭКО в прошлом. Биология и генетика эмбриона зависит как от качества ооцита, так и от качества сперматозоида [1].

**Целью данной работы** было проведение ПГД эмбрионов у пациентов, в ядрах сперматозоидов которых с помощью метода флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) было выявлено высокое содержание анеуплоидий хромосом X, Y, 18. Половые и 18-я хромосомы были выбраны для анализа спермы, как наиболее распространенные варианты анеуплоидий в ядрах сперматозоидов [2]. Показанием для проведения анализа спермы на наличие хромосомных аномалий являлись такие отклонения в спермограмме пациентов, как олиго- и тератозооспермия [3].

**Объект и методы исследования.** В ходе выполнения программ ЭКО процедуру ПГД прошло 25 пар. Средний возраст пациенток на момент обращения в клинику составил  $33 \pm 3,3$  года. Всем партнерам в парах был проведен анализ

спермы методом FISH и выявлены хромосомные аномалии в ядрах сперматозоидов половых и 18 хромосом. Средний возраст обследованных мужчин составил  $36,7 \pm 3,8$  лет. Для контролируемой стимуляции овуляции (КСО) пациенток применяли длинный протокол с а-ГнРГ. Для поддержки лютеиновой фазы применяли препараты прогестеронового ряда. Полученные после трансвагинальной пункции ооциты и зиготы в течение двух дней культивировались в средах Universal IVF Medium (Medicult). Эмбрионы, начиная с третьего дня развития и до стадии бластоцисты, культивировались в среде BlastAssist (Medicult). Ооциты и полученные после оплодотворения эмбрионы культивировались при температуре  $36,8\text{ C} - 37,0\text{ C}$ ; при содержании  $\text{CO}_2$  5,5%.

Биопсия бластомеров проводилась на 3-й день после трансвагинальной пункции, при достижении эмбрионов 6-8-бластомерной стадии развития. Биопсию проводили в фосфатном буфере, не содержащем ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (Biopsy Medium, Medicult) [5]. Отверстие в зоне пеллюцида было выполнено с помощью лазерной установки OCTAX LaserShot (MTG, Германия). Бластомер из эмбриона извлекали с помощью механических микроманипуляторов (Narishige, Япония) и микропипеток для биопсии (Cook). Эмбрионы после

биопсии культивировались в среде BlastAssist (Medicult) в отдельных каплях по 25 мкл.

ПГД с помощью метода FISH была выполнена по стандартному протоколу, рекомендуемому Abbott-Vysis (США). Биопсированные blastомеры отдельно помещались на стекла Superfrost Plus (Kindler GmbH, Германия) в гипотонический раствор 1M HCL и 1% Tween 20 (Sigma) [3, 4]. Ядра blastомеров были зафиксированы с помощью этанол/уксусного фиксатора при соотношении 3:1. Изучение хромосомных аномалий в ядрах blastомеров по X, Y, 18-й и 21-й хромосомам проводилось с использованием флуоресцентных ДНК-зондов (Vysis, США). Результаты ПГД были зафиксированы с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse 80i и цитогенетической программы Lucia FISH (Laboratory Imaging LTD, Чехия).

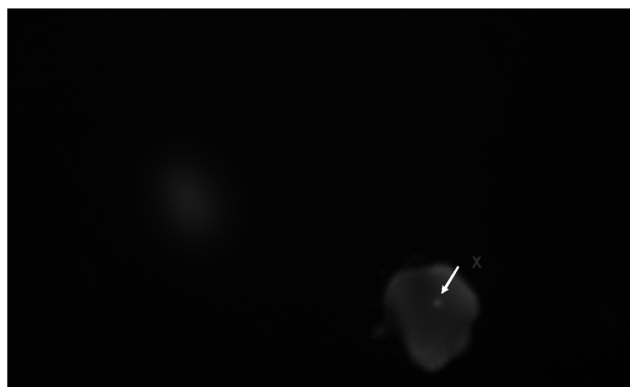
Перенос эмбрионов в полость матки выполнялся на пятый день развития эмбриона на стадии blastоцисты или morулы.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Процедуру ПГД в программе ЭКО прошло 25 пар. Всего было исследовано 86 эмбрионов. Для проведения ПГД отбирались эмбрионы наиболее высокого качества. Хромосомные аномалии были обнаружены у 17 эмбрионов (19,76% всех исследованных эмбрионов). При этом 3 пациентов (12%) все проанализированные эмбрионы содержали хромосомные аномалии. У 19 эмбрионов (22,1%) ядра в blastомерах отсутствовали. 10 ядер (11,6% ядер) было разрушено при проведении ПГД. Реакция прошла в 91,9% случаев. Особенности анеуплоидий 17-ти аномальных эмбрионов представлены в таблице 1. Фотографии отдельных анеуплоидий представлены на рис. 1-3.

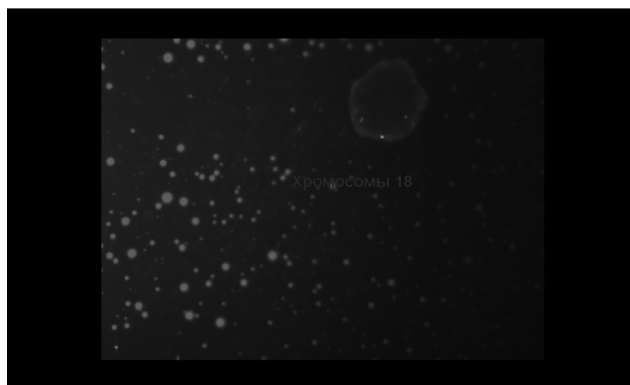


**Рис. 1. Тетрасомия по хромосоме 21 (хромосомы 21-красный сигнал)**

После биопсии положительная динамика наблюдалась у 76% эмбрионов. Для переноса в полость матки были отобраны только эмбрионы с нормальным количеством хромосом. После получения результатов ПГД было проведено 19 переносов. Процент наступления беременности составил 21% (4 беременности).



**Рис. 2. Моносомия по половым хромосомам (хромосома X – синий сигнал)**



**Рис. 3. Трисомия по хромосоме 18 (хромосома 18 – синий сигнал)**

**Таблица 1**

**Результаты обнаруженных анеуплоидий**

Характер анеуплоидий	Количество аномальных эмбрионов, n	Количество аномальных эмбрионов, %
Количественные нарушения половых хромосом	12	70,6
Анеуплоидии аутосом	4	23,6
Анеуплоидии половых хромосом и аутосом	1	5,8

**Выводы.** Данная работа подтверждает необходимость проведения ПГД с целью анализа анеуплоидий у эмбрионов по хромосомам 18, 21, X, Y при обнаружении хромосомных аномалий в ядрах сперматозоидов пациентов с олиго- и тератозооспермией. Быстрота проведения ПГД методом FISH позволяет повысить вероятность рождения здорового ребенка после проведения программы ЭКО. Данное исследование показывает, что наиболее частыми являются анеуплоидии половых хромосом. Поэтому анализ половых хромосом при проведении ПГД необходимо рас-

смагивать как обязательный тест при наличии показаний в ходе программы ЭКО.

**Перспективы дальнейших исследований.** Учитывая прямую зависимость между наличием анеуплоидий у эмбрионов по хромосомам 18, 21, X, Y и обнаружением хромосомных аномалий в ядрах сперматозоидов пациентов с олиго- и тератозооспермией, перспективным является расширить спектр исследуемых хромосом с целью преимплантационной генетической диагностики. Интересна возможность исследования корреляции результатов ПГД после биопсии эмбрионов на третий день и биопсии на стадии бластоцисты (на пятые сутки развития эмбрионов) для изучения частоты мозаицизма.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Материалы XXV научной сессии НИИ акушерства и гинекологии. - М. : Под редакцией Э.К.Айламазяна, 1996-1997. - с.17 - 19
2. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия (теоретические и практические подходы): Руководство для врачей / Под ред. В.И. Кулакова, Б.В. Леонова. - 2-е изд., доп. - М.: Медицинскоу информационное агентство, 2004. - 782 с.
3. Alan R. Thornhill, Karen S. Molecular diagnostics in preimplantation genetic diagnosis// Journal of Molecular Diagnosis.-2002.-Vol. 4.-№ 1.-P.11-29.
4. Sarah E. D., Sean P.F., Colin D. M. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using in-situ hybridization // Molecular Human Reproduction.-1997.-Vol. 3.-№ 7.-P. 585-598.
5. Staessen C., Hortourne H., Michiels A., Devroey P., Lierbaers I. PGD in 47, XXY Klinefelter's syndrome patients // Human Reproduction.-2003.-Vol. 9.-№ 4.-P. 319-330.

**УДК** 573.6:577.21-076

**Феськов А.М., Феськова И.А., Жилкова Е.С., Грабарь В.В., Блажко О.В.**

### **ПРЕИМПЛАНТАЦИОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЭМБРИОНОВ ПАЦИЕНТОВ С НАЛИЧИЕМ ХРОМОСОМНЫХ АНЕУПЛОИДИЙ В ЯДРАХ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПО ХРОМОСОМАМ X, Y, 18**

**Резюме.** Проведена преимплантационная генетическая диагностика (ПГД) эмбрионов пациентов, в ядрах сперматозоидов которых с помощью метода флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) было выявлено высокое содержание анеуплоидий хромосом X, Y, 18. С помощью метода FISH проведен анализ эмбрионов на наличие анеуплоидий по хромосомам X, Y, 18 и 21. В полость матки были перенесены только эмбрионы с нормальным набором хромосом.

**Ключевые слова:** преимплантационная генетическая диагностика, анеуплоидии, FISH.

**УДК** 573.6:577.21-076

### **ПЕРЕДІМПЛАНТАЦІЙНА ГЕНЕТИЧНА ДІАГНОСТИКА ЕМБРІОНІВ ПАЦІЄНТІВ З НАЯВНІСТЮ ХРОМОСОМНИХ АНЕУПЛОЇДІЙ У ЯДРАХ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПО ХРОМОСОМАМ X, Y, 18**

**Феськов О.М., Феськова І.А., Жилкова Є.С., Грабарь В.В., Блажко О.В.**

**Резюме.** Проведена передімплантаційна генетична діагностика (ПГД) ембріонів пацієнтів, у ядрах сперматозоїдів яких за допомогою метода флуоресцентної гібридизації in situ (FISH) було виявлено великий зміст анеуплоїдій хромосом X, Y, 18. За допомогою метода FISH проведено аналіз ембріонів на наявність анеуплоїдій по хромосомам X, Y, 18 й 21. У порожнину матки було перенесено лише ембріони з нормальним набором хромосом.

**Ключові слова:** передімплантаційна генетична діагностика, анеуплоїдії, FISH

**UDC** 573.6:577.21-076

### **PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSTICS for EMBRYOS of PATIENTS with ANEUPLOIDIES of CHROMOSOMES X, Y, 18 in SPERMATOZOA NUCLEI**

**Feskov O., Feskova I., Zhylkova I., Grabar V., Blazhko O.**

**Summary.** Preimplantation genetic diagnostics of embryos for patients with chromosomal anomalies in spermatozoa nuclei of chromosomes X, Y, 18 found by FISH method was carried out. Embryos' examination on chromosomes X, Y, 18, 21 was carried out using FISH method. Only normal embryos were transferred to uterus cavity.

**Key words:** preimplantation genetic diagnostics, aneuploidies, FISH.

**Стаття надійшла 15.01.2011 р.**