

Оцінювання ролі чоловічого фактора при лікуванні безпліддя у пацієнтів із множинними невдалими спробами використання допоміжних репродуктивних технологій

Д.О. Микитенко, Ю.В. Маслій, К.В. Лаврова

Клініка репродуктивної медицини «НАДІЯ», м. Київ

Досліджено ефективність використання програм передімплантаційного генетичного скринінгу ембріонів в програмах лікування безпліддя за допомогою допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) залежно від наявності чоловічого фактора безпліддя. Установлено, що еуплоїдні ембріони подружніх пар з вираженим чоловічим фактором характеризуються зниженим імплантаційним потенціалом, можливо, через епігенетичні порушення та/чи деградацію ДНК сперматозоїдів. Обґрунтовано подальші шляхи проведення досліджень у галузі метаболоміки, протеоміки ембріонів.

Ключові слова: безпліддя, чоловічий фактор, передімплантаційний генетичний скринінг.

Попри досягнення сучасної медицини, наша держава продовжує входити до переліку країн зі складною ситуацією відносно поширеності безпліддя (>3% первинного та >13% вторинного) [1]. Подальше погіршення екологічних та економічних умов є додатковими обтяжувальними факторами стосовно демографічної ситуації. Відомо, що зниження фертильності є своєрідним захисним природним механізмом, який запобігає народженню дітей у носіїв, в першу чергу, генетично-зумовленої патології. З цього погляду доцільно проблему безпліддя розглядати як похідну комплексу пре-, власне-, постгонадальних, гіпоталамо-гіпофізарних факторів, чинників внутрішнього та зовнішнього середовища, які можуть провокувати як структурні, так і функціональні порушення, та з яких лише незначна частка може бути реально керована з метою зниження частоти патології.

Це зумовлює надзвичайну актуальність удосконалення методів лікування безпліддя. З останніх статистичних даних відомо, що у структурі захворюваності жіноче та чоловіче безпліддя складають 78,1% та 21,9% відповідно [2]. У випадку останнього проводити лікування шляхом допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) доцільно із застосуванням запліднення ICSI/IMSI з наступним проведенням передімплантаційного генетичного скринінгу ембріонів. Але зрозуміло, що, навіть відібравши морфологічно найоптимальніший сперматозоїд для запліднення і припустивши гаплоїдність його хромосомного набору, ми не можемо бути впевненими в адекватному функціонуванні його генетичного апарату. Відтак, даних щодо результативності таких програм накопичено недостатньо.

Мета дослідження: встановити ефективність використання програм передімплантаційного генетичного скринінгу ембріонів залежно від наявності чоловічого фактора безпліддя.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Основну групу пацієнтів склали подружжя з множинними невдалими спробами лікування безпліддя за допомогою ДРТ ($3,9 \pm 0,8$ циклу), з нормальними каріотипами та віком жінок $33,9 \pm 5,4$ року. Усім подружнім парам проводили цикли ДРТ із застосуванням передімплантаційного генетичного скринінгу (ПГС) ембріонів методом порівняльної геномної гібридизації на мікрочіпах (aCGH). Дослідження проведені на 182 ембріонах у 33 циклах ДРТ з інформованої згоди пацієнтів. Запліднення ооцитів здійснювали методом ICSI незалежно від показників спермограми. З метою виключення генетичних факторів обструктивної та необструктивної форм порушень сперматогенезу, у вибірку не включали подружні пари, в яких чоловік був носієм мутацій гена муковісцидозу (CFTR) чи мікрodelецій Y-хромосоми (в локусах AZFa, AZFb, AZFc) відповідно. З метою проведення ПГС виконували лазерну біопсію ембріонів на стадії бластоцисти (5-а доба розвитку), досліджуваний матеріал – клітини трофектодермальної оболонки. Біопсію здійснювали за наявності не менше 3 ембріонів, якість яких не нижче за 3BV із хетчингом, що розпочався. Ембріони після біопсії вітрифікувались та використовувались у подальших кріоциклах.

Клітини трофектодерми ембріонів лізувались з наступним проведенням повногеномної ампліфікації (SurePlex DNA Amplification system, BlueGnome, Ltd., UK). Проби та референсу ДНК позначали різними барвниками (Cy3 і Cy5) (Fluorescent Labelling System [dCTP], BlueGnome, Ltd., UK), після чого комбінували згідно з протоколом виробника, змішували з COT Human DNA (1 mg/ml, BlueGnome, Ltd., UK), DS Hybridization buffer (BlueGnome, Ltd., UK), денатурували протягом 10 хв за температури 75 °C і гібридизували протягом 18 год на чіпах 24sureV3 (BlueGnome, Ltd., UK) за температури 47 °C. Після відмивання чіпи сканували за допомогою Innopscan 710 (Innopsys, France), отримані зображення обробляли програмним забезпеченням BlueFuseMulti v. 3.1 (BlueGnome, Ltd., UK). Накладання «сітки», кількісне оцінювання, нормалізацію та постпроцесинг проводили в автоматичному режимі. Хромосомний профіль оцінювали на наявність додаткового чи втрати генетичного матеріалу (gain & loss) на основі відхилення сегмента від ізолінії на величину $3xSD$ та/або $0,3 \log_2\text{-ratio}$ [3].

У подальшому група пацієнтів ретроспективно була розділена залежно від наявності чоловічого фактора.

За чоловічий фактор прийняті такі відхилення спермограми, що виходять за межі нормальних (концентрація сперматозоїдів ≥ 20 млн/мл, активно рухливих (категорії A) $\geq 25\%$, морфологічно нормальних $\geq 15\%$).

Ефективність програм аCGH-ПГС залежно від наявності чоловічого фактора

Показник	Група пацієнтів з множинними невдалими циклами ДРТ			Статистика
	Загальна група	З розподілом за наявністю чоловічого фактора		
		З відхиленнями спермограми	Без відхилень спермограми	
Кількість циклів	33	17	16	-
Вік жінки	34,8	36,8±4,4	33,0±5,8	P>0,05
Еуплоїдних ембріонів	52,7%	49,4%	55,8%	P>0,05
Ембріонів на перенос	1,56 (47)	1,2 (19)	2 (28)	P<0,05
Ембріотрансферів	30	16	14	-
Завершених циклів	90,9%	94,1%	86,5%	P>0,05
Клінічних вагітностей	19 (6 дв)	7 (1 дв)	12 (5 дв)	P<0,05
Вагітностей на пункцію	57,6%	41,2%	75%	P<0,05
Вагітностей на перенос	63,3%	43,8%	85,7%	P<0,05
Частота імплантації	53,2%	42,1%	60,7%	P<0,05
Невиношування вагітності	5 (26,3%)	2 (28,5%)	3 (25%)	P>0,05

У групі пацієнтів з наявністю чоловічого фактора проведено 17 циклів ДРТ із застосуванням ПГС, у групі без чоловічого фактора – 16. Середній вік жінки становив 36,8±4,4 та 33,0±5,8 відповідно.

Статистичний аналіз проводили з використанням F-тесту (для співставлення кількісних показників, що характеризуються нормальним розподілом варіаційного ряду), непараметричних критеріїв Колмогорова–Смірнова (для аналізу кількісних величин з розподілом варіаційного ряду, відмінним від нормального) та непараметричного критерію Пірсона (χ^2) (для аналізу таблиць спряження 2x2). Критичним рівнем значущості статистичних критеріїв вважали значення $P \geq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведення ПГС методом аCGH дозволило встановити, що 52,7% 5-денних ембріонів у групі з множинними невдалими циклами ДРТ не мали незбалансованих хромосомних аномалій, що дозволяло вважати їх euploidними/збалансованими. Відповідно, 47,3% були з хромосомними аномаліями. За даними L. Vilton та співавторів [4], серед 3-денних ембріонів в аналогічній групі пацієнтів частка анеуплоїдних ембріонів складала 53,9% при дослідженні методом аCGH та 36,2% – методом FISH. Згідно з даними G.S. Caglar і співавторів [5], частка анеуплоїдних ембріонів у групі пацієнтів з множинними невдалими спробами ДРТ при дослідженні FISH коливається в межах 25,4–67,5% і залежить від кількості досліджуваних хромосом, а також свідчить про можливі відмінності у підходах формування вибірки. Стосовно аCGH, через «молодість» метода ще не накопичено детальної статистики в науковій літературі. Наприклад, є дані, що у пацієнтів зі сприятливим прогнозом стосовно досягнення вагітності анеуплоїдія ембріонів на 5-й день розвитку методом аCGH визначається в 44,9% [6]. А за даними S. Munne [7], в загальній (безвибіркової) групі частка анеуплоїдних ембріонів складає 69% і 51% на 3-й і 5-й день розвитку відповідно.

Результати аналізу наведені в таблиці.

Співставляючи власні дані з результатами, опублікованими в доступній науковій літературі стосовно пацієнтів з множинними невдалими спробами ДРТ, слід зазначити, що вдалося досягти 21% вагітностей/перенесень при частоті імплантації 15% у випадку застосування аCGH [4]. При використанні FISH аналогічні показники були на рівні 11% і 7% відповідно. Оглядові дані [5] свідчать про те, що результативність застосування FISH з метою ПГС в аналогічній групі пацієнтів становить, як правило, 14–34,7% вагітностей/перенесень при частоті імплантації 10–24,2%. У безвибіркової групі пацієнтів, за даними Reprogenetics [7], використання аCGH при дослідженні 3-денних ембріонів з метою ПГС дозволяє досягти частоти настання вагітності 39% і 54% на цикл та ембріотрансфер відповідно при рівні імплантації 39%. У випадку аналізу 5-денних ембріонів – 50% (з розкидом 26–73% залежно від клініки) і 67% (53–94%) на цикл та ембріотрансфер відповідно при рівні імплантації 61%. У групі пацієнтів зі сприятливим прогнозом [6] відзначають частоту досягнення вагітності на перенесення 71%.

Аналізуючи внесок чоловічого фактора в ефективність програм ПГС та циклів ДРТ слід зазначити, що частка euploidних ембріонів статистично значущо не відрізнялась між підгрупами залежно від наявності відхилень у спермограмі, що, ймовірно, вимагає більш масштабних досліджень з метою підвищення чутливості статистичного аналізу.

У підгрупі без відхилень у спермограмі спостерігалася вища частота вагітностей на пункцію та перенесення ($P < 0,05$). Можливо, це пов'язане з більшою середньою кількістю ембріонів на перенесення, адже у подружніх пар з чоловічим фактором далеко не в кожному випадку було доступно більше одного euploidного ембріона на перенесення. Водночас, в підгрупі без вираженого чоловічого фактора спостерігався більш високий показник імплантації ($P < 0,05$). Оскільки нашими спостереженнями не вдалося виявити зв'язок між хромосомним набором ембріона та показниками його морфокінетики [8, 9], можна припустити існування інших чинників, що слід урахувати для проведення циклів ДРТ у випадку порушення сперматогенезу. Імовірно, до них

необхідно віднести порушення епігенетичного профайла сперматозоїдів та/чи деградацію ДНК. Це зумовлює необхідність подальшого розвитку та вдосконалення принципів ПГС з метою врахування наведених факторів.

Оскільки запліднення в нашому випадку проводили методом ICSI, то мова швидше має йти саме про претестикулярні та тестикулярні чинники, що включають як генетичні (генні та/чи хромосомні порушення), так і негенетичні (вік, гормональний статус, уроджені аномалії, новоутворення та вплив токсичних речовин, включно з нікотиним та алкоголем) чинники. Відомий не один десяток генів, експресія яких на певному етапі індивідуального розвитку є критично важливою для статевої диференціації та продукції сперматозоїдів [10]. Дія більшості чинників в першу чергу зумовлена критичним зсувом балансу окисно-відновних реакцій й порушенням функціонування і цілісності генетичного апарату сперматозоїда.

ВИСНОВКИ

Проведення циклів ДРТ для пацієнтів із множинними невдалими спробами лікування безпліддя є більш результативним у випадку використання ПГС ембріонів. Однак нижчий показник імплантації ембріонів у підгрупі пацієнтів з порушеннями спермограми дозволяє зауважити на існуванні чинників, асоційованих з цілісністю та функціонуванням генетичного апарату сперматозоїдів, що продовжує лишатися дослідженням вкрай недостатньо. Проведення подальших досліджень у галузі метаболоміки, протеоміки ембріонів та імплантатів їх результатів у клінічну практику дозволить підняти ефективність застосування програм ПГС-ДРТ на якісно новий рівень.

Сведения об авторах

Микитенко Дмитрий Александрович – Клиника репродуктивной медицины «Надия», 03037, г. Киев, ул. Максима Кривоноса 19-а; тел.: (044) 592-21-78. E-mail: d.mykytenko@genetics.kiev.ua

Лаврова Екатерина Васильевна – Клиника репродуктивной медицины «Надия», 03037, г. Киев, ул. Максима Кривоноса 19-а; тел.: (044) 537-75-97

Маслий Юлия Владимировна – Клиника репродуктивной медицины «Надия», 03037, г. Киев, ул. Максима Кривоноса 19-а; тел.: (044) 537-75-97

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Mascarenhas M.N. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys / M.N. Mascarenhas, S.R. Flaxman, T. Boerma // *PLoS Med.* – 2012. – Vol. 9 (12). – e1001356.
2. Юзько О.М. Стан та перспективи використання допоміжних репродуктивних технологій при лікуванні безпліддя в Україні / О.М. Юзько, Т.А. Юзько, Н.Г. Руденко // *Неонатологія, хірургія та перинатальна медицина.* – 2012. – Т. II, № 4 (6). – С. 26–30.
3. Fiorentino F. PGD for reciprocal and Robertsonian translocation using array comparative genomic hybridization / F. Fiorentino, L. Spizzichino, S. Bono et al. // *Hum Reprod.* – 2011. – Vol. 26, N 7. – P. 1925–1935.
4. Wilton L. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure / L. Wilton, L. Voullarie, P. Sargeant et al. // *Fertility and Sterility.* – 2003. – Vol. 80, N 4. – P. 860–868.
5. Caglar G.S. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in repeated implantation failure / G.S. Caglar, B. Asimakopoulou, N. Norkkila et al. // *RBM online.* – 2005. – Vol. 10, N 3. – P. 381–388.
6. Yang Z. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study / Z. Yang, J. Liu, G.S. Collins et al. // *Molecular Cytogenetics.* – 2012. – Vol. 5, N 2. – P. 1–8.
7. Munne S. Preimplantation Genetic Diagnosis for Aneuploidy and Translocations Using Array Comparative Genomic Hybridization / S. Munne // *Current Genomics.* – 2012. – Vol. 13. – P. 463–470.
8. Mazur P. Time-lapse investigation of embryos with different types of aneuploidy / P. Mazur, V. Nagornyy, D. Mykytenko et al. // *Reproductive BioMedicine Online. Abstracts of the 12th International Conference of Preimplantation Genetic Diagnosis, 8–11th May 2013, Istanbul, Turkey.* – 2013. – Vol. 26, suppl. 1. – P. S18.
9. Semenyuk L. Time-lapse and aCGH, Is There Any Connection between Ploidy and Embryo Cleavage Timing on Early Stages of Embryo Development? / L. Semenyuk, P. Mazur, D. Mikitenko et al. // *PCRS Abstracts. – Fertility and Sterility.* – Vol. 99, N 3, SuppMerch 1. – P. S6.
10. Matzuk M.M. The Biology of infertility: research advances and clinical challenges / M.M. Matzuk, D.L. Lamb // *Nature. Medicine.* – 2008. – Vol. 14, N 11. – P. 1197–1213

Статья поступила в редакцию 27.06.2013

Оценка роли мужского фактора при лечении бесплодия у пациентов с многократными неудачными попытками использования вспомогательных репродуктивных технологий Д.А. Микитенко, Ю.В. Маслий, К.В. Лаврова

Исследована эффективность применения программ преимплантационного генетического скрининга эмбрионов в программах лечения бесплодия с помощью вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) в зависимости от наличия мужского фактора бесплодия. Установлено, что эуплоидные эмбрионы супружеских пар с выраженным мужским фактором характеризуются сниженным имплантационным потенциалом, возможно, по причине эпигенетических нарушений и/или деградации ДНК сперматозоидов. Обоснованы дальнейшие пути проведения исследований в области метаболомики и протеомики эмбрионов.

Ключевые слова: бесплодие, мужской фактор, преимплантационный генетический скрининг.

An estimation of male factor role in treatment of patients with multiple ivf failures D.O. Mykytenko, Y.V. Masliy, K.V. Lavrova

It was investigated the efficiency of preimplantation genetic screening application in ART treatment of patients with pronounced male factor. It was shown that euploid embryos of such patients have decreased an implantation potential, possibly, due to epigenetic alterations and/or sperm DNA degradation. The results justify the further investigation in the fields of embryo metabolomics and proteomics.

Key words: infertility, male factor, preimplantation genetic screening.