

Прогноз отримання еуплоїдних ембріонів у програмах ДРТ із застосуванням ПГС

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

Клініка репродуктивної медицини «Надія», м. Київ

У роботі показано залежне від віку жінки зниження середньої кількості отриманих ембріонів у циклах ДРТ, частоти бластуляції та зростання кількості анеуплоїдів в ембріонах за рахунок множинних хромосомних аномалій. Розраховано частку еуплоїдних ембріонів, придатних до переносу, залежно від зазначених показників, ймовірність закінчення циклу переносом принаймні одного еуплоїдного ембріона в залежності від віку. Надано рекомендації стосовно проведення преімплантаційних генетичних досліджень та включення пацієнтів старших вікових груп до програм накопичення ембріонів.

Ключові слова: ДРТ, преімплантаційний генетичний скринінг, анеуплоїдія, прогнозування.

Програми преімплантаційних генетичних досліджень на сьогодні стали невід'ємною частиною лікування безпліддя методами допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ), оскільки дають змогу виключити хромосомну чи генну патологію ембріона ще до переносу у порожнину матки. Сучасний арсенал включає низку методів обмеженого та то-

тального хромосомного скринінгу, серед яких преімплантаційний генетичний скринінг (ПГС) методом порівняльної геномної гібридизації (ПГГ) є на сьогодні «золотим стандартом» дослідження ембріонів. Особливо він є актуальним в когорті пацієнтів підвищеного ризику: з повторними невдалими циклами ДРТ, звичним невиношуванням вагітності, підвищеним рівнем анеуплоїдії сперми, вагітністю плодом з хромосомною аномалією в анамнезі тощо.

Однак при включенні таких пацієнтів до програм ДРТ логічно виникають складнощі у прогнозуванні результативності циклу залежно від віку пацієнтки та її оваріального резерву.

Метою роботи стало встановлення частки доступних на перенос ембріонів в рамках програм ДРТ-ПГС-ПГГ з метою удосконалення медико-генетичного консультування пацієнтів перед включенням їх до циклу та вибором оптимальної тактики ведення таких подружніх пар.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В проведені ретроспективного дослідження були включені подружні пари підвищеного ризику отримання анеуп-

Таблиця 1

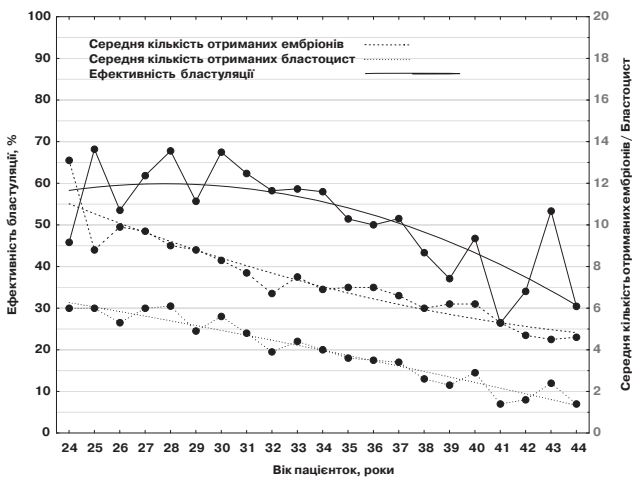
Кількість отриманих ембріонів та ефективність бластуляції у розрізі віку пацієнтки

Вік пацієнтки	Кількість отриманих ембріонів		Кількість отриманих бластоцист		Ефективність бластуляції, %	Частка еуплоїдних бластоцист Відн, %	Частка на перенос (від вихідної кількості ембріонів) Відн, %
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD			
24	13,14	4,45	6,00	3,79	45,8	62,5	28,6
25	8,85	4,95	6,00	2,58	68,2	75,0	51,1
26	9,86	6,73	5,27	4,29	53,5	59,1	31,6
27	9,70	4,77	6,00	3,95	61,9	75,0	46,4
28	9,03	4,73	6,08	4,14	67,8	75,5	51,2
29	8,83	4,64	4,88	3,63	55,7	61,8	34,4
30	8,35	5,15	5,57	4,22	67,5	69,8	47,1
31	7,72	4,59	4,78	3,56	62,3	61,0	38,0
32	6,74	4,57	3,89	3,56	58,2	48,3	28,1
33	7,48	4,68	4,42	3,73	58,7	52,9	31,1
34	6,94	4,50	3,99	3,78	58,0	57,5	33,4
35	6,99	4,79	3,58	3,65	51,4	51,2	26,3
36	7,00	4,68	3,50	3,44	50,0	40,0	20,0
37	6,61	4,48	3,39	3,20	51,5	40,6	20,9
38	6,01	4,16	2,56	3,10	43,3	52,6	22,8
39	6,24	4,48	2,35	2,73	37,1	34,8	12,9
40	6,23	4,28	2,92	3,09	46,8	50,0	23,4
41	5,33	4,11	1,39	1,93	26,4	28,6	7,5
42	4,65	3,31	1,57	1,90	34,0	37,5	12,8
43	4,45	2,38	2,36	2,01	53,3	5,6	3,0
44	4,64	3,07	1,36	1,86	30,4	8,3	2,5

Розподіл ембріонів (стадія бластоцисти) за кількістю хромосомних аномалій залежно від віку пацієнтки

Вік	Еуплоїдні		Анеуплоїдні					
			Аномалія за однією хромосомою		Аномалія за двома хромосомами		Аномалія за трьома та більше хромосомами	
	Абс.	Відн, %	Абс.	Відн, %	Абс.	Відн, %	Абс.	Відн, %
24	10	62,5	4	25	0	0	2	12,5
25	3	75,0	0	0,0	1	25,0	0	0,0
26	13	59,1	7	31,8	2	9,1	0	0,0
27	6	75,0	2	25,0	0	0,0	0	0,0
28	37	75,5	10	20,4	0	0,0	2	4,1
29	21	61,8	8	23,5	4	11,8	1	2,9
30	30	69,8	7	16,3	5	11,6	1	2,3
31	25	61,0	12	29,3	3	7,3	1	2,4
32	14	48,3	10	34,5	2	6,9	3	10,3
33	9	52,9	6	35,3	1	5,9	1	5,9
34	42	57,5	18	24,7	9	12,3	4	5,5
35	22	51,2	13	30,2	4	9,3	4	9,3
36	4	40,0	5	50,0	1	10,0	0	0,0
37	13	40,6	13	40,6	5	15,6	1	3,1
38	10	52,6	8	42,1	1	5,3	0	0,0
39	8	34,8	9	39,1	4	17,4	2	8,7
40	1	50,0	0	0,0	1	50,0	0	0,0
41	6	28,6	9	42,9	5	23,8	1	4,8
42	6	37,5	5	31,3	2	12,5	3	18,8
43	2	5,6	11	30,6	9	25,0	14	38,9
44	1	8,3	4	33,3	0	0,0	7	58,3
Усього	283	-	161	-	59	-	47	-

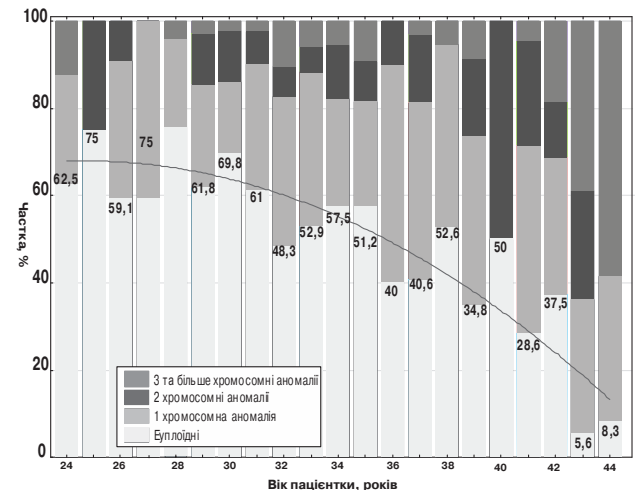
лоїдних ембріонів, що проходили лікування безпліддя в рамках програм ДРТ Клініки репродуктивної медицини «Надія» в період з 01.01.2012 по 31.12.2013 р. із застосуванням ПГС з метою ПГС. У вибірку включені подружні пари, що не були носіями хромосомних перебудов та не застосували доначію гамет чи ембріонів. Вибірка включала 155 подружніх пар, в яких вік жінки коливався в межах 24–44 роки (середній вік – 34,2±4,5). Даний віковий діапазон був обумовлений наявністю пацієнтів, у яких була можливість проведення ПГС-ПГГ з використанням власних ооцитів.



Мал. 1. Розподіл кількості отриманих ембріонів та бластоцист залежно від віку пацієнтки

Преімплантаційний генетичний скринінг (ПГС) 550 ембріонів проводили в лабораторії молекулярної діагностики Клініки репродуктивної медицини «Надія» методом тотального геномного скринінгу – ерей-порівняльної геномної гібридизації (ПГГ) – на момент проведення дослідження найбільш потужного та широкоживаного методу, використання було вже багаторазово обґрунтовано як з метою ПГС [1–4], так і постнатальних (у т.ч. онкологічних і наукових) дослідженнях [5–7].

Преімплантаційні дослідження ембріонів проводили в



Мал. 2. Розподіл ембріонів (стадія бластоцисти) за кількістю хромосомних аномалій залежно від віку пацієнтки

Прогноз наявності еуплоїдних ембріонів для трансферу після проведення ПГГ-ПГС залежно від віку та кількості отриманих бластоцист

Досліджених бластоцист	Вікова група, років				
	<30	31-35	36-40	41-42	43-44
1-3	100	86	66	50	30
	45	52	38	25	11
4-5	100	86	86	73	35
	60	45	41	50	30
6-8	67	53	47	29	41
	67	53	47	29	41
>8	100	100	100	100	100
	48	61	45	56	66

Примітка: «жирний» шрифт – частка пацієнтів з принаймні одним еуплоїдним ембріоном, %; курсив – частка еуплоїдних ембріонів, %.

рамках циклів ДРТ з інформованої згоди пацієнтів. Запліднення ооцитів відбувалось методом інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїдів (ICSI) на базі ембріологічної лабораторії Клініки репродуктивної медицини «Надія». Лазерну біопсію ембріонів проводили на стадії бластоцисти (5–6-та доба розвитку) при якості ембріонів не нижче «3ВВ». Досліджений матеріал – клітини трофектодермальної оболонки. Ембріони після біопсії вітрифікували для подальшого використання у кріоциклах ДРТ.

З метою проведення аналізу клітини трофектодерми ембріонів лізували з подальшим проведенням повногеномної ампліфікації (SurePlex DNA Amplification system, BlueGnome, ltd., UK), міченням (Fluorescent Labelling System [dCTP], BlueGnome, ltd., UK), гібридизацією на чіпах 24sureV3 (BlueGnome, ltd., UK).

Після відмивки чіпа висушувались та сканувались за допомогою Innoscan 710 (Innopsys, France). Отримані зображення обробляли за допомогою програмного забезпечення BlueFuseMulti v. 3.1 (BlueGnome, ltd., UK) відповідно до рекомендованих критеріїв [8].

Статистичну обробку результатів власних досліджень проводили з використанням програм Statistica 8.0 («StatSoft, Inc.», США) та Microsoft® Excel 2007 («Microsoft Corporation», США). До проведення статистичного аналізу кількісних показників встановлювався розподіл у варіаційному ряді за допомогою тесту Колмогорова–Смірнова. При цьому із сукупності даних отримувались наступні описові статистичні індикатори: середнє арифметичне варіаційного ряду (Mean, \bar{x}); помилка середнього арифметичного (SE); стандартне відхилення (SD); медіана (Me); сукупність значень (Σ). Усереднені чи розрахункові числові показники в роботі наведено зі стандартним відхиленням ($\pm SD$), якщо не вказано інше.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Середню кількість отриманих ембріонів після запліднення ооцитів та отриманих в подальшому бластоцист наведено у табл. 1 при розподілі за віком пацієнтів.

Аналіз отриманих даних свідчить щодо зниження з віком кількості отриманих ембріонів після запліднення ооцитів ($F=3,80$, $P=0,000$) та кількості бластоцист ($F=634$, $P=0,000$). Загальна ефективність бластуляції склала $43,4 \pm 32,6\%$. Величина великого стандартного відхилення обумовлена наявністю пацієнтів з відсутністю бластоцист. Залежність ефективності бластуляції від вікового показника характеризувалась вираженим зниженням ($F=5,94$, $P=0,000$). Описані тенденції графічно подані на мал. 1.

Зосередимо увагу на розподілі ембріонів (на стадії бластоцист) за кількістю хромосомних аномалій. За результата-

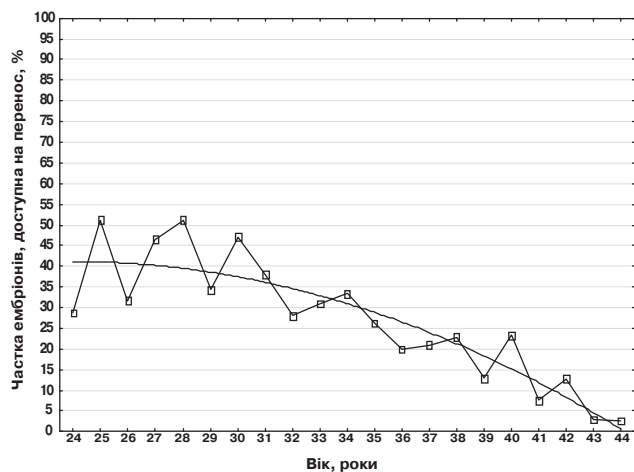
ми дослідження, ембріони були розподілені на еуплоїдні та анеуплоїдні (з анеуплоїдією по одній, двом та більше хромосомам), що представлено в табл. 2 та на мал. 2.

Проведемо спробу проаналізувати представлені дані. Як випливає з даних табл. 2 та графічного представлення на мал. 2, частка еуплоїдних ембріонів починає спадати з 60–70% у віці 30 років до ~30–40% у 42 роки з наступним різким падінням до 43–44 роки, що співпадає з тенденціями, які спостерігались [9, 10]. Частка анеуплоїдних ембріонів зростає в основному за рахунок ембріонів з множинними хромосомними аномаліями. Коментуючи аналогічні тенденції, що спостерігались в аналогічному дослідженні, [11] зазначає: на сьогодні залишається не до кінця зрозумілим – чи то така картина обумовлена зростанням ймовірності виникнення хромосомних аномалій у мейозі, чи зниженням функціональних можливостей до їх попередження / корекції, однак зауважує на тому, що співвідношення трисомії / моносомії зсунуте у бік моносомії у молодих жінок та трисомії – у жінок старшої вікової групи.

З урахуванням тенденції графіку ефективності бластуляції та пропорцій розподілу бластоцист за кількістю хромосомних аномалій вважалося за можливе вирахувати частку ембріонів від їх вихідної кількості, що будуть еуплоїдними й доступними для ембріотрансферу. Дані зведено до табл. 1 та мал. 3.

Аналіз даних свідчить, що частка ембріонів, доступна для ембріотрансферу, поступово падає, починаючи з 30 років, а загальна тенденція описується формулою (1) з достовірністю апроксимації $R^2=0.79$:

$$NN=41,069+0,1952 \times (X-21) - 0,101 \times (X-21)^2. (1)$$



Мал. 3. Частка еуплоїдних ембріонів (від вихідної кількості), доступна для переносу після проведення ПГГ-ПГС

З метою більш наочного представлення матеріалу та зручності використання отриманих даних для консультування пацієнтів, що включаються до програм ДРТ, вдалося доцільним згрупувати отримані результати дослідження за віковими групами та кількістю досліджених ембріонів, що наведено у табл. 3.

З наведеної табл. 3 є можливість зробити висновок, що зі зростанням вікового показника та зменшенням кількості досліджених ембріонів (як правило, саме така тенденція спостерігається у вікових пацієнток через зменшення оваріального резерву) падає ймовірність отримання, принаймні, одного еуплоїдного ембріона для наступного трансферу, що супроводжується підвищенням частоти незавершених циклів. Даний факт підкреслює доцільність використання методів тотального геномного преімплантаційного скринінгу ембріонів у таких пацієнтів та, у разі проведення ДРТ-

циклів на власних ооцитах, включення їх до програм накопичення ембріонів.

ВИСНОВКИ

Консультування подружніх пар перед включенням їх до циклів ДРТ має враховувати встановлені вікові тенденції зниження частоти бластуляції та кількості отриманих ооцитів, що позначатиметься на зниженні ймовірності закінчення циклу переносом ембріона. Ріст частки анеуплоїдних ембріонів з віком за рахунок множинних хромосомних аномалій обумовлює доцільність застосування програм преімплантаційного генетичного скринінгу методами повногеномного аналізу. Пацієнти з низькою ймовірністю отримання доступних для переносу еуплоїдних ембріонів із метою підвищення результативності циклів ДРТ мають бути зорієнтовані у програми накопичення ембріонів.

Прогноз получения эуплоидных эмбрионов в программах ВРТ с применением ПГС

Д.А. Микитенко, К.В. Лаврова, Ю.В. Маслий, В.Д. Зукин

В работе показано возраст-зависимое снижение среднего количества полученных эмбрионов в циклах ВРТ, частоты бластуляции и увеличения количества анеуплоидий в эмбрионах за счет множественных хромосомных аномалий. Рассчитана доля эуплоидных эмбрионов, доступных для переноса, в зависимости от указанных показателей, вероятность окончания цикла переносом, по крайней мере, одного эуплоидного эмбриона в зависимости от возраста. Даны рекомендации в отношении проведения преимплантационных генетических исследований и включения пациентов старших возрастных групп в программы накопления эмбрионов.

Ключевые слова: ВРТ, преимплантационный генетический скрининг, анеуплоидия, прогнозирование.

Prognostication of obtaining of euploid embryos in ART cycles using PGS

D.O. Mykytenko, K.V. Lavrova, Yu.V. Masliy, V.D. Zukin

It was shown the age-related decreasing of main quantity of obtained embryos in ART cycles, frequency of blastulation and increasing of quantity of aneuploidies on account of multiple chromosomal anomalies. It were calculated the proportion of euploid embryos are available for transfer according to mentioned parameters, probability of ART cycle closure by transferring at least one euploid embryo according to maternal age. Recommendations are proposed in relation of preimplantation genetic investigation and including of advanced age patients to the embryo banking programs.

Key words: ART, preimplantation genetic screening, aneuploidy, prognostication.

Сведения об авторах

Микитенко Дмитрий Александрович – лаборатория молекулярной диагностики Клиники репродуктивной медицины «Надия», 03037, г. Киев, ул. Максима Кривоноса, 19-А; тел.: (044) 592-21-78. E-mail: d.mykytenko@ivf.com.ua

Лаврова Екатерина Васильевна – лаборатория молекулярной диагностики Клиники репродуктивной медицины «Надия», 03037, г. Киев, ул. Максима Кривоноса, 19-А; тел.: (044) 592-21-78. E-mail: k.lavrova@ivf.com.ua

Маслий Юлия Владимировна – Клиника репродуктивной медицины «Надия», 03037, г. Киев, ул. Максима Кривоноса, 19-А; тел.: (044) 537-7-597. E-mail: y.masliy@ivf.com.ua

Зукин Валерий Дмитриевич – Клиника репродуктивной медицины «Надия», 03037, г. Киев, ул. Максима Кривоноса, 19-А; тел.: (044) 537-7-597. E-mail: v.zukin@ivf.com.ua

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Voullaire L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization / L. Voullaire, H. Slater, R. Williamson, L. Wilton // Hum Genet. – 2000. – Vol. 106. – P. 210–217.
2. Fishel S. Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy – the future of IVF? / S. Fishel, A. Gordon, C. Lynch [et al.] // Fertil Steril. – 2010. – Vol. 93, N. 3. – P. 1006.e.7–1006.e.10.
3. Микитенко Д.О. Порівняльна геномна гібридизація: новий стандарт діагностики в репродуктивній медицині / Д.О. Микитенко, В.Д. Зукин // Здоровье женщины. – 2010. – № 9 (55). – С. 183–187.
4. Микитенко Д.О. Нова парадигма доімплантаційної генетичної діагностики / Д.О. Микитенко, В.Д. Зукин, О.В. Підгорна // Здоровье женщины. Научно-практический журнал. – 2011. – № 8 (64). – С. 24–32.
5. Kallioniemi A. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors / A. Kallioniemi, O.P. Kallioniemi, D. Sudar [et al.] // Science. – 1992. – Vol. 258, N. 5083. – P. 818–821.
6. Микитенко Д.О. Аналітичні принципи та технології / Д.О. Микитенко / Клінічна біохімія: [підручник] / За заг. ред. Г.Г. Луньової. – К.: Атіка, 2013. – 1156 [114–164] с.
7. Акоюн Г.Р. Порівняльний аналіз каріотипу нової лінії клітин людини 4BL6 в умовах тривалого культивування. Плоїдність хромосомного набору / Г.Р. Акоюн, Н.Л. Гуленюк, В.О. Кушнірук, Д.О. Микитенко, А.П. Яцишина, Л.Л. Лукаш // Цитологія і генетика. – 2013. – Т. 47, № 5. – С. 55–69.
8. 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.
9. Chiang T. Meiotic Origins of Maternal Age-Related Aneuploidy / T. Chiang, R.M. Schultz, M.A. Lampson // Biology of reproduction. – 2012. – Vol. 86, N. 1. – P. 1–7.
10. Danylevska A. Causes and consequences of maternal age-related aneuploidy in oocytes: a review / A. Danylevska, J. Sebestova // Veterinarni Medicina. – 2013. – Vol. 58, N. 2. – P. 65–72.
11. Franasiak J.M. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening / J.M. Franasiak, E.J. Forman, K.H. Hong [et al.] // Fertility and Sterility. – 2014. – Vol. 101, N. 3. – P. 656–663.e.1.

Статья поступила в редакцию 12.05.2014