
Клиническая медицина

УДК 577.21:618.177-089.888.11

ПРЕИМПЛАНТАЦИОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЭМБРИОНОВ В ПРОГРАММЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ КАК СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ

И. Н. Фетисова^{2,1*}, доктор медицинских наук,
А. И. Малышкина^{1,2}, доктор медицинских наук,
С. С. Семененко¹, доктор медицинских наук,
Е. Л. Бойко¹, кандидат медицинских наук,
Е. В. Полумискова¹, кандидат медицинских наук,
Н. С. Фетисов^{1,2}

¹ ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава России, 153045, Россия, г. Иваново, ул. Победы, д. 20.

² ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, 153012, Россия, г. Иваново, Шереметевский просп., д. 8.

*Ответственный за переписку (corresponding author): ivgenlab@gmail.com.

РЕЗЮМЕ *Актуальность.* Нарушение раннего эмбрионального развития в подавляющем большинстве случаев определяется генетической неполноценностью эмбриона/плода. Преимплантационная генетическая диагностика (ПГД) эмбрионов методом aCGH – сравнительной геномной гибридизации на чипах в программе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) – является высокоинформативным методом диагностики, позволяющим определять численные и структурные (делеции и дупликации) аномалии хромосом эмбриона.

Цель – оценить частоту и спектр хромосомных аномалий эмбрионов, полученных в программе ЭКО.

Материал и методы. Методом aCGH было выполнено исследование 70 образцов трофоэктодермы эмбрионов, полученных от 25 супружеских пар в программе ЭКО.

Результаты. Из образцов трофоэктодермы, полученных от 70 эмбрионов, нормальный кариотип выявлен у 24 (34,3%); численные и/или структурные аномалии кариотипа диагностированы у 46 (65,7%). Спектр выявленных аномалий был следующим: так называемый хаотичный кариотип, при котором имеют место множественные численные и структурные хромосомные аномалии, – в 11,2% случаев, трисомии по одной паре хромосом – в 12,9%, моносомии по одной паре – в 8,6%; сочетанные численные аномалии по аутосомам (одновременное присутствие три- и моносомий по двум и трем парам хромосом) – в 14,3%; численные аномалии по половым хромосомам – в 8,6%; делеции и дупликации – в 17,2%.

При исследовании эмбрионов, полученных от супругов с нормальным кариотипом (23 из 25 обследованных пар) в 62,7% случаев диагностирован несбалансированный аномальный кариотип.

Заключение. Полученные результаты позволяют рекомендовать проведение ПГД эмбриона не только в случае наличия хромосомных aberrаций у самих супругов, но и во всех случаях использования вспомогательных репродуктивных технологий.

Ключевые слова: беременность, эмбрион, преимплантационная диагностика, генетические аномалии.

Нарушение репродуктивной функции супружеской пары (бесплодие, невынашивание беременности, наличие врожденных пороков развития у плода) является чрезвычайно гетерогенным полиэтиологическим состоянием, поскольку обусловлено множеством наследственных и средовых факторов [4]. Расстройство фертильности в ряде случаев определяется патоло-

гией репродуктивной системы женщины или мужчины либо обоих супругов, в ряде случаев – генетической неполноценностью эмбриона/плода. Известна следующая закономерность: чем раньше нарушается течение беременности, тем выше вероятность наличия дисбаланса наследственного материала развивающегося организма. Остановка внутриутробного

развития и элиминация генетически аномального потомства является отражением действия стабилизирующего естественного отбора, направленного на поддержание генетического здоровья вида [5].

Зарождение эмбриона с хромосомным дисбалансом может быть вызвано наличием сбалансированных структурных хромосомных перестроек у родителей, при которых закономерно нарушается ход гаметогенеза, формируются аномальные гаметы, участие которых в процессе оплодотворения и определяет наличие генетической патологии у зародившегося организма. Однако практика медико-генетического консультирования показывает, что в супружеских парах с нарушенной репродуктивной функцией (НРФ) наличие хромосомных aberrаций у одного из супругов определяется не более чем в 5–7% семей [4]. В подавляющем большинстве случаев у супругов с нарушенным деторождением при цитогенетическом обследовании диагностируется нормальный кариотип, следовательно, хромосомный дисбаланс эмбриона связан со случайными геномными или хромосомными мутациями, возникающими в ходе гаметогенеза у родителей. Как известно, основным фактором риска возникновения подобных генеративных мутаций является возраст родителей, хотя нельзя исключать негативного влияния на ход гаметогенеза других факторов (наличие воспалительного процесса, использование определенных групп лекарственных препаратов, а также присутствие в генотипах супругов негативных полиморфизмов по ряду групп генов, в частности фолатного цикла) [4, 9].

В настоящее время при лечении бесплодия супружеских пар широко используются вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), которые предполагают получение, культивирование эмбрионов и перенос их в полость матки. Качество эмбрионов оценивается врачом-эмбриологом по морфологическим критериям (форма и скорость дробления бластомеров, наличие вакуолизации и фрагментации цитоплазмы). Однако в литературе есть данные, свидетельствующие о высокой частоте хромосомных аномалий у морфологически хороших эмбрионов [6, 7]. То есть к моменту переноса эмбриона в полость матки не все генетические аномалии успевают реализоваться, а проявляются на более поздних стадиях внутриутробного развития, определяя замершие беременности, наличие врожденных пороков развития плода, мертворождение и рождение ребенка с хромосомной патологией. Таким образом, при использовании программ ВРТ одной из актуальных становится проблема диагностики генетической полноценности эмбриона, предшествующей переносу его в полость матки, поскольку этот факт является одним из основополагающих для наступления и течения беременности до завершения ее рождением здорового потомства.

ПГД – диагностика генетических заболеваний у эмбриона человека перед имплантацией в слизистую оболочку матки, то есть до начала беременности. Обычно для анализа проводится биопсия одного бластомера у эмбриона, находящегося на стадии дробления (4–10 бластомеров). При материнском носительстве наследственной патологии возможна биопсия 1-го и 2-го полярных телец яйцеклетки до оплодотворения. В последние годы наиболее часто проводят биопсию трофобластической оболочки (внешнего слоя клеток) на стадии бластоцисты (пятый день развития эмбриона) [8].

В течение длительного времени «золотым стандартом» ПГД было использование метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (от англ. *fluorescent in situ hybridization, FISH*). Однако данный метод позволяет диагностировать анеуплоидии по ограниченному числу хромосом (13, 18, 21 пары, X и Y хромосомы), поскольку применяется с использованием соответствующих ДНК-зондов [3]. Следовательно, большое число хромосомных аномалий эмбриона остается вне поля зрения исследователя. В настоящее время широкое применение получили методы, позволяющие анализировать весь эмбриональный геном: *aCGH* (от англ. *comparative genomic hybridization*) и метод NGS (*next generation sequencing* – секвенирование нового поколения), основанный на определении последовательности ДНК [1–3].

Цель настоящего исследования – оценить частоту и спектр хромосомных аномалий эмбрионов, полученных в программе ЭКО.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава России с 2018 года проводится ПГД эмбрионов с помощью *aCGH*. Метод позволяет анализировать все 23 пары хромосом (22 пары аутомосом, X и Y хромосомы). Возможна диагностика численных аномалий кариотипа эмбриона, а также выявление делеций и дупликаций, то есть частичных моно- и трисомий. Данный метод обладает высокой чувствительностью и точностью и позволяет проводить анализ по единственной клетке. Валидация *aCGH*, по данным литературы, показала его высокую эффективность: только для 2,9% эмбрионов результат анализа не был получен, а уровень ошибки составил 1,9% [3]. Таким образом, определению данным методом подлечит любой несбалансированный (с измененным количеством ДНК) геном эмбриона.

С апреля по октябрь 2018 года ПГД была проведена у 70 эмбрионов, полученных в программе ЭКО от 25 супружеских пар. Средний возраст женщин составил $37,48 \pm 0,47$ года; мужчин – $39,23 \pm 0,35$ года. Спектр патологии в супружеской паре, повлекшей

необходимость применения ВРТ, распределился следующим образом. В 63,0% случаев имел место трубно-перитонеальный фактор бесплодия; в 24,0% случаев наблюдалось эндометриозассоциированное бесплодие; синдром поликистозных яичников, нарушение менструальной функции по типу ановуляции – в 11,0%; наличие мужского фактора было отмечено у 45,0% супружеских пар. У 17,0% женщин предшествующая программа ЭКО завершилась наступлением беременности, самопроизвольным прерыванием ее в первом триместре и диагностической численных и структурных аномалий эмбриона/плода.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное цитогенетическое обследование супружеских пар выявило наличие особенностей кариотипа в двух из 25 случаев. Пациентка П., 39 лет, с привычным ранним невынашиванием беременности в анамнезе являлась носителем сбалансированной транслокации с участием хромосом из 2 и 13 пар; кариотип – 46, XX, t (2; 13) (p21; q12). У пациентки Н., 37 лет, с эндометриозассоциированным бесплодием в анамнезе в 50,0% проанализированных метафаз была определена маркерная хромосома. Применение С-окраски при анализе хромосомного препарата позволило установить, что маркерная хромосома представлена гетерохроматином, то есть высоко повторяющимися участками ДНК, не содержащими уникальных последовательностей.

Анализ образцов трофобласта, полученных от 70 эмбрионов с помощью аCGH, показал наличие нормального кариотипа у 24 эмбрионов (34,3%); соответственно численные и/или структурные аномалии кариотипа были диагностированы у 46 эмбрионов (65,7%).

Спектр выявленных аномалий был следующим. Так называемый хаотичный кариотип, при котором имеют место множественные численные и структурные хромосомные аномалии, был выявлен в 8 случаях (11,2%).

Трисомии по одной паре хромосом были определены в 9 случаях (12,9%), из них в 2 (2,9%) был диагностирован синдром Дауна (трисомия 21), по одному случаю (1,4%) – синдром Патау (трисомия 13) и синдром Эдвардса (трисомия 18); также диагностированы трисомии по 2, 4, 7 и 22 парам хромосом. Из девяти случаев диагностированных трисомий в двух имел место мозаичный вариант патологии.

Моносомии по одной паре хромосом имели место в 6 наблюдениях (8,6%), из которых в двух выявлена моносомия по 19 паре хромосом и по одному наблюдению – по 4, 7, 13 и 20 парам хромосом.

Сочетанные численные аномалии по ауто索мам (одновременное присутствие три- и моносомий по двум и трем парам хромосом) имели место у 10 исследованных образцов (14,3%); например: 45, XX (+3,-8,-18); 46, XY (-18,+19).

У шести эмбрионов были выявлены численные аномалии по половым хромосомам (8,6%), среди которых в одном случае диагностирована моносомия X, в трех – синдром Клайнфельтера (47, XXY) и в двух образцах – полисомия по Y хромосоме (47, XYY). Характерно, что оба случая определения поли-Y приходились на супружескую пару, где возраст мужчины составил 62 года. Как известно, большинство мутаций, обусловленных нарушением процесса мейотического расхождения хромосом, происходят в овогенезе; при этом одним из основных факторов риска является возраст женщины [6, 7, 9]. Однако в подавляющем большинстве случаев, когда находка при ПГД касается измененного числа ауто索м или X хромосом, невозможно с точностью определить родительскую принадлежность аномальной гаметы, участвовавшей в оплодотворении. В случаях с полисомией по Y хромосоме можно точно констатировать факт нарушенного сперматогенеза и, как в нашем случае, связать его помимо прочих факторов (наличие воспалительного процесса) с возрастом пациента.

Структурные аномалии хромосом, связанные с делециями и дупликациями, были выявлены в 12 образцах (17,2%). В частности три- и моносомии были вовлечены хромосомы 2, 3, 6, 7, 9, 10, 16, 17, 19 пар хромосом.

Также представляет интерес частота встречаемости аномалий в зависимости от наличия изменений кариотипа родителей. У двух пациенток с особенностями кариотипа (см. выше) было получено и проанализировано 11 эмбрионов. У пациентки П., носительницы сбалансированной транслокации t (2; 13) (p21; q12), из пяти проанализированных эмбрионов нормальный кариотип не был определен ни в одном случае. У пациентки Н., имеющей маркерную хромосому (мозаичный вариант), из шести проанализированных эмбрионов в двух случаях был диагностирован нормальный кариотип.

У супругов с нормальным кариотипом (23 супружеских пары) было получено 59 эмбрионов, среди которых генетические аномалии выявлены в 62,7% случаев.

Возможно, дальнейшее накопление материала внесет некоторые коррективы в полученные нами результаты, однако уже сегодня можно сказать, что частота мутаций в гаметогенезе у лиц с нормальным кариотипом, нуждающихся в лечении бесплодия с помощью ВРТ, чрезвычайно высока, что может быть обусловлено возрастом супругов и наличием определенной патологии, ограничивающей фертильность пары.

ВЫВОДЫ

1. При генетическом анализе эмбрионов, полученных от супружеских пар, нуждающихся в лечении бесплодия с помощью ВРТ и имеющих нормальный кариотип, патологии не выявлено только в 37,3% случаев, а в 62,7% у эмбрионов диагностирован несбалансированный аномальный кариотип.
2. Высокое число выявленных генетически аномальных эмбрионов позволяет сделать вывод о том, что показанием к проведению ПГД, помимо наличия хромосомных aberrаций у самих супругов, должен являться сам факт использования ВРТ.
3. ПГД целесообразно проводить в скринирующем режиме, что позволит увеличить вероятность наступления беременности и завершения ее рождением здорового потомства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вспомогательные репродуктивные технологии у супружеских пар с высоким риском генетических нарушений. Преимплантационный генетический скрининг / Е. В. Кулакова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2017. – № 8. – С. 21–27.
2. Роль преимплантационного генетического скрининга в эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с привычным невынашиванием беременности (обзор литературы) / О. Е. Коротченко [и др.] // Пробл. репродукции. – 2017. – Т. 23, № 2. – С. 50–55.
3. Сыркашева, А. Г. Бесплодие у женщин старшего репродуктивного возраста: причины, тактика ведения, перспективы использования преимплантационного генетического скрининга (обзор литературы) / А. Г. Сыркашева, Е. О. Ильина, Н. В. Долгушина // Гинекология. – 2016. – № 3. – С. 40–43.
4. Фетисова, И. Н. Наследственные факторы при различных формах нарушения репродуктивной функции супружеской пары / И. Н. Фетисова, Л. В. Посисеева, А. В. Поляков. – Иваново : ОАО «Издательство «Иваново», 2009. – 240 с.
5. Шмальгаузен, И. И. Факторы эволюции (теория стабилизирующего отбора) / И. И. Шмальгаузен. – М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1946. – 396 с.
6. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles / F. Fiorentino [et al.] // Hum. Reprod. – 2014. – Vol. 29(12). – P. 2802–2813.
7. Fragouli, E. Aneuploidy in the human blastocyst / E. Fragouli, D. Wells // Cytogenet. Genome Res. – 2011. – Vol. 133(2–4). – P. 149–159.
8. Harper, J. C. Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011 / J. C. Harper, S. B. SenGupta // Human Genetics. – 2012. – Т. 131, № 2. – С. 175–186.
9. Citrinin exposure affects oocyte maturation and embryo development by inducing oxidative stress-mediated apoptosis / Y. Wu [et al.] // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8 (21). – P. 34525–34533.

PRE-IMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS OF EMBRYOS IN THE PROGRAM OF EXTRACORPORAL FERTILIZATION AS A PREVENTIVE MEAN OF HEREDITARY PATHOLOGY

I. N. Fetisova, A. I. Malyshkina, S. S. Semenenko, E. L. Boiko, E. V. Polumiskova, N. S. Fetisov

ABSTRACT *Actuality.* Disorder of early embryo development in the most cases is determined by genetic defect of embryo/fetus. Embryo pre-implantation genetic diagnosis by aGGH technique – comparative genomic hybridization on chips in the program of extracorporal fertilization is proved to be high-informative diagnostic technique which allowed to determine numerical and structural (deletions and duplications) anomalies of embryo chromosomes.

Objective: to evaluate frequency and spectrum of chromosome aberrations in embryos obtained according to extracorporal fertilization program.

Materials and methods. 70 samples of embryo trophoctoderma were obtained from 25 couples in extracorporal fertilization program; these samples were examined by aGGH technique.

Results. From trophoctoderma samples obtained from 70 embryos normal karyotype was revealed in 24 embryos (34,3%); numerical and structural karyotype abnormalities were diagnosed in 46 (65,7%). The spectrum of the abnormalities revealed was as follows: so called chaotic karyotype when multiple numerical and structural chromosome abnormalities were presented – in 11,2% cases; trisomies by one pair of chromosomes – in 12,9% cases; monosomies by one pair – in 8,6%; combined numerical abnormalities by autosomes (simultaneous presence of tri- and monosomies by two and three pairs of chromosomes) – in 14,3% cases; numerical abnormalities by sexual chromosomes – in 8,6%; deletions and duplications – in 17,2%. In the examination of embryos obtained from couples with normal karyotype (23 from 25 couples examined) imbalanced abnormal karyotype was diagnosed in 62,7% cases.

Conclusions. The obtained results allowed to recommend to perform embryo prenatal genetic diagnosis both in case of chromosome aberrations' presence in couple itself and in all cases of supplementary reproductive technologies application.

Key words: pregnancy, embryo, preimplant diagnosis, genetic abnormalities.