

## РЕЗУЛЬТАТЫ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ У ПАЦИЕНТОК ПОЗДНЕГО РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

**И. Н. Фетисова**<sup>2, 1\*</sup>, доктор медицинских наук,  
**А. И. Малышкина**<sup>1, 2</sup>, доктор медицинских наук,  
**Е. Л. Бойко**<sup>1</sup>, доктор медицинских наук,  
**С. С. Семененко**<sup>1</sup>, кандидат медицинских наук,  
**Н. С. Фетисов**<sup>1, 2</sup>, кандидат медицинских наук,  
**Е. В. Савельева**<sup>2</sup>,  
**А. А. Кручинин**<sup>2</sup>,  
**В. С. Чериков**<sup>2</sup>

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

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

**РЕЗЮМЕ** Цель – определить частоту анеуплоидии у эмбрионов, полученных в программах вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста.

**Материал и методы.** Основную группу составили 30 женщин позднего репродуктивного возраста (36 лет и старше), группу сравнения – 29 беременных в возрасте 35 и менее лет. Проведено преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов, полученных в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), методом сравнительной геномной гибридизации на чипах.

**Результаты и обсуждение.** У эмбрионов, полученных у пациенток, возраст которых не превышал 35 лет, анеуплоидия выявлена в 62,7% случаев; у женщин позднего репродуктивного возраста – в 77,8% ( $p = 0,048$ ;  $OR = 2,07$  (1,01–4,37)). У пациенток 36–39 лет частота анеуплоидии составила 35,0%, старше 40 лет – 93,75% ( $p = 0,001$ ;  $OR = 8,79$  (2,23–58,38)).

Полученные результаты подтверждают постулат о необходимости выполнения преимплантационного генетического тестирования эмбрионов, полученных у женщин старшей возрастной группы, особенно у пациенток 40 лет и старше.

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

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

Возраст женщины, в течение которого она способна к рождению ребенка, называется репродуктивным, или фертильным. В пределах этого периода выделяют поздний репродуктивный возраст (ПРВ), который соответствует 35 годам и старше. Пациентки ПРВ имеют ряд особенностей, затрудняющих реализацию детородной функции, что обусловлено действием на женский организм многих средовых и генетических факторов. Вместе с тем эта проблема является социально значимой, так как доля женщин, планирующих беременность и роды в ПРВ, неуклонно растет во всем мире [3].

У женщин старше 35 лет происходит постепенное снижение овариального резерва, который определяют как способность яичников адекватно отвечать на овариальную стимуляцию ростом полноценных фолликулов, содержащих полноценные овоциты. Снижение овариального резерва связано с уменьшением пула фолликулов, нарушением фолликулогенеза, усилением

апоптоза и атрезии фолликулов [1–4]. По данным ряда авторов, у женщин старшего репродуктивного возраста помимо ослабления овариального резерва имеет место снижение качества образующихся гамет, что связано с увеличением вероятности случайного нерасхождения хромосом в процессе гаметогенеза и возникновения генеративной мутации *de novo*. Необходимо подчеркнуть, что среди генетических причин нарушения репродуктивной функции, а именно, самопроизвольного прерывания беременности и формирования врожденных пороков развития плода, на первое место следует поставить хромосомный дисбаланс эмбриона. Риск возникновения случайных мутаций в гаметогенезе существует в любом возрасте, однако он неуклонно нарастает по ходу онтогенеза и затрагивает главным образом овогенез [1–4].

Метод преимплантационного генетического тестирования эмбрионов с целью выявления анеуплоидии

(ПГТ-А) является методом их селекции в программах ВРТ. В настоящее время среди репродуктологов, эмбриологов и генетиков ведется широкая дискуссия о влиянии на качество гамет и, соответственно, эмбрионов различных факторов: гинекологической и андрологической патологии у супругов, являющейся причиной бесплодного брака, различных протоколов овариальной стимуляции, а также возраста супругов. Ответ на эти вопросы позволит дать оценку клинико-экономической эффективности применения ПГТ и оптимизировать тактику ведения в программах ВРТ пациенток разных возрастных категорий с различными причинами нарушения репродукции.

Целью настоящего исследования явилось определение частоты анеуплоидии эмбрионов, получаемых в программах ВРТ, у пациенток ПРВ.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на базе отделения ВРТ и лаборатории клинической биохимии и генетики ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава России.

Методом сравнительной геномной гибридизации на чипах (comparative genomic hybridization, aCGH) было выполнено генетическое тестирование 147 эмбрионов, полученных в программах ВРТ у 59 пациенток. Все обследуемые обратились в отделение ВРТ ИвНИИ МиД имени В.Н. Городкова с целью лечения бесплодия с помощью ВРТ. Основную группу составили 30 женщин ПРВ (36 лет и старше), у которых было получено 72 эмбриона; группу сравнения составили 29 пациенток, возраст которых не превышал 35 лет; у них было получено 75 эмбрионов. Исследованию подвергали клетки трофобласта, биопсия которых выполнялась на пятые сутки культивирования эмбрионов.

Проводили молекулярно-цитогенетический анализ образцов трофобласта, на основании чего диагностировали численные и структурные хромосомные аномалии забранных образцов.

Преимплантационное генетическое тестирование выполняли методом сравнительной геномной гибридизации на чипах. Принцип метода заключался в сравнении исследуемой ДНК с референсной ДНК, по результатам которого можно сделать вывод о сбалансированности исследуемого генома, то есть о наличии в нем делеций или дупликаций по сравнению с референсным. Исследуемая ДНК подвергалась фрагментации и мечению разными флуоресцентными красителями, после чего смешивалась и наносилась на биочип, который представлял собой стеклянную пластину с нанесенными на нее ДНК-зондами. Зондами называются короткие молекулы ДНК длиной порядка 60 нуклеотидов, последовательность которых выбрана так, чтобы наиболее полно пред-

ставлять геном человека. Комплементарные участки исследуемой ДНК связываются с соответствующими ДНК-зондами, после чего происходит сканирование данного чипа и делается заключение о генетической структуре изучаемой ДНК. Интенсивность и цвет свечения тех или иных зондов позволяют делать вывод о наличии делеций и дупликаций в исследуемом регионе.

Статистический анализ проводили с помощью программы StatSoft STATISTICA 6.0. Для сравнения показателей использовали критерий  $\chi^2$ . Рассчитывали показатель отношения шансов (OR), приводя 95%-ный доверительный интервал (95% CI).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Возраст пациенток основной группы варьировал от 36 до 43 лет; в группе сравнения – от 22 до 35 лет. Средний возраст женщин основной и контрольной групп составил соответственно  $40,34 \pm 4,53$  и  $31,7 \pm 2,58$  года ( $p < 0,001$ ). У обследованных обеих групп среди причин, повлекших необходимость лечения бесплодия с помощью ВРТ, был выявлен трубно-перитонеальный фактор (38,5 и 41,4% случаев в основной и контрольной группах соответственно) и нарушение менструальной функции по типу ановуляции (27,6 и 23,7%). Указание в анамнезе на предшествующие неудачные попытки экстракорпорального оплодотворения имели все женщины основной группы и 17 пациенток (58,6%) группы сравнения. Количество таких попыток в обеих группах варьировало от одной до пяти. Стаж бесплодия в основной группе составил  $9,32 \pm 6,31$  года; в контрольной –  $6,55 \pm 3,92$  года.

Результаты молекулярно-цитогенетического анализа образцов трофобласта показали, что у пациенток группы сравнения среди 75 эмбрионов эуплоидными были 28, что составило 37,3%. Соответственно анеуплоидия (численные и структурные хромосомные аномалии) была выявлена у 47 эмбрионов (62,7%). У женщин ПРВ среди 72 образцов сбалансированный геном имели лишь 16 эмбрионов (22,2%), анеуплоидными были соответственно 56 эмбрионов (77,8%), что было достоверно выше, чем в группе сравнения ( $p = 0,048$ ;  $OR = 2,07 (1,01-4,37)$ ). Полученные нами данные согласуются с мнением ряда авторов о значимом увеличении формирования аномальных гамет и эмбрионов у женщин ПРВ [5–8]. Несмотря на тот факт, что изначально преимплантационная генетическая диагностика эмбрионов была разработана для выявления нарушений у потомства пар с моногенными заболеваниями (муковисцидоз, миопатия Дюшена), вскоре она стала применяться главным образом для выявления анеуплоидии эмбрионов, основным фактором риска которой является возраст матери.

Получив столь высокий процент аномальных эмбрионов у женщин основной группы, мы постави-

ли своей целью проанализировать этот показатель у той части пациенток, возраст которых варьировал от 40 до 43 лет. Таких женщин было 14, и у них было получено 32 эмбриона. Среди проанализированных 32 эмбрионов зуплоидными оказались только два, что составило 6,25%. Таким образом, анализ частоты анеуплоидии эмбрионов, полученных у женщин, возраст которых варьирует от 36 до 39 лет, и эмбрионов, полученных у пациенток в возрасте 40 лет и старше, показал статистически достоверную разницу в количестве получаемых в программах ВРТ аномальных эмбрионов. У пациенток 36–39-летнего возрастного диапазона частота анеуплоидии составила 35,0%, что было сопоставимо с данными в группе сравнения (37,3%), но с высокой степенью достоверности превышало аналогичный показатель у эмбрионов, полученных у женщин 40 лет и старше (6,25%;  $p = 0,001$ ,  $OR = 8,79$  (2,23–58,38)). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что основной вклад в широкую

распространенность аномальных эмбрионов у пациенток ПРВ вносят женщины старше 40 лет, у которых резко возрастает частота генеративных мутаций. По данным F. Pellestor (2003), доля овоцитов с разными видами анеуплоидии прогрессивно увеличивается с возрастом и может достигать 100% у женщин старше 45 лет [8].

Таким образом, полученные результаты подтверждают постулат о необходимости выполнения ПГТ эмбрионов, полученных у женщин старшей возрастной группы, особенно у пациенток 40 лет и старше. Помимо вышеуказанных показаний, рекомендации к проведению тестирования эмбрионов в программе ВРТ должны быть обусловлены тем фактом, что результаты исследования могут служить дополнительным аргументом в пользу принятия женщиной решения об использовании в программе экстракорпорального оплодотворения донорских овоцитов.

## 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 повышении эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста / Е. П. Бейк [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2018. – № 4. – С. 78–84.
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. Преимплантационная генетическая диагностика эмбрионов в программе экстракорпорального оплодотворения как способ профилактики наследственной патологии / И. Н. Фетисова [и др.] // Вестн. Ивановской медицинской академии. – 2018. – Т. 23, № 3. – С. 10–13.
5. Denson, V. Diagnosis and Management of infertility / V. Denson // J. Nutse Pract. – 2006. – Vol. 2(6). – P. 380–386.
6. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial / T. Hardarson [et al.] // Hum. Reprod. – 2008. – Vol. 23(12). – P. 2806–2812.
7. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization / G. L. Harton [et al.] // Fertil. Steril. – 2013. – Vol. 100(6). – P. 1695–1703.
8. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes / F. Pellestor [et al.] // Hum. Genet. – 2003. – Vol. 112(2). – P. 195–203.

## THE RESULTS OF EMBRYO PREIMPLANT GENETIC TEST IN PATIENTS OF TARDY REPRODUCTIVE AGE

I. N. Fetisova, A. I. Malyshkina, E. L. Boiko, S. S. Semenenko, N. S. Fetisov, E. V. Salelieva, A. A. Kruchinin, V. S. Chirikov

**ABSTRACT Objective** – to determine the incidence of aneuploidy in embryo which were obtained in the programs of additional reproductive technologies in patients of tardy reproductive age.

**Material and methods.** 30 women of tardy reproductive age (36 years and older) were enrolled into basic group, 29 women aged 35 years and younger composed comparison group. Preimplantation genetic test of embryos which were obtained in the programs of additional reproductive technologies was performed by the technique of comparative genome hybridization on chips.

**Results and discussion.** Aneuploidy was revealed in 62,7% cases in embryos which were obtained in patients aged 35 years and younger; in women of tardy reproductive age – in 77,8% ( $p = 0,048$ ;  $OR = 2,07$  (1,01–4,37)). In patients aged 36–39 years aneuploidy incidence was amounting to 35%, older than 40 years – 93,75% ( $p = 0,001$ ;  $OR = 8,79$  (2,23–58,38)).

The obtained results confirmed the postulate upon the necessity of obligatory preimplantation genetic test of embryos which were obtained in women from senior age group especially in patients aged 40 years and older.

**Key words:** pregnancy, embryo, preimplantation diagnosis, genetic abnormalities.