

8. Salyha Y. Biological effects assessment of chlorpyrifos and some aspects of its neurotoxicity /Y. Salyha // Visnyk of Lviv University. Biology series. – 2010. – V. 54. – P. 3-14.
9. Slotkin T.A. Oxidative and excitatory mechanisms of developmental neurotoxicity: transcriptional profiles for chlorpyrifos, diazinon, dieldrin, and divalent nickel in PC12 cells / Slotkin T. A., Seidler F. J // Environ Health Perspect. – 2009. – V. 117(4). – P. 587-96.

УДК 611.013 + 575

КІЛЬКІСНІ ХРОМОСОМНІ АНОМАЛІЇ ЕМБРІОНІВ, ОТРИМАНИХ У ЦИКЛАХ ЗАПЛІДНЕННЯ *IN VITRO* З ДОНАЦІЄЮ ООЦИТІВ

Чапля О.В., аспірант, біолог*

*Центр молекулярних та клітинних досліджень Національного університету «Києво-Могиллянська академія», *ТОВ «Інститут генетики репродукції»*

Проведено преімплантаційний генетичний скринінг 174 бластомерів ембріонів, отриманих у циклах запліднення *in vitro* із донацією ооцитів з метою оцінки впливу хромосомної аномалії на ранній розвиток ембріонів молодих фертильних жінок. Показано, що лише 36,2 % ембріонів були еуплоїдними за 7 досліджуваними хромосомами, що вірогідно є сукупним наслідком гормональної стимуляції супероуляції та природних характеристик людини. Утім, аналіз морфологічних показників патологічних та еуплоїдних ембріонів дозволив встановити, що хромосомно збалансовані ембріони частіше (65 % проти 50,4 %) формують бластоцисту, отже мають вищий імплантаційний потенціал.

Ключові слова: преімплантаційний генетичний скринінг, анеуплоїдії, ембріон, донація ооцитів

Чапля О.В. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХРОМОСОМНЫЕ АНОМАЛИИ ЭМБРИОНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ В ЦИКЛАХ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ *IN VITRO* С ДОНОРСКИМИ ООЦИТАМИ / Национальный университет «Києво-Могиллянська академія», *ООО «Інститут генетики репродукції», г. Київ, Україна

Проведен преимплантационный генетический скрининг 174 эмбрионов, полученных в циклах оплодотворения *in vitro* с донацией ооцитов с целью оценки влияния хромосомных аномалий на раннее развитие эмбрионов молодых фертильных женщин. Показано, что euploidными по 7 исследуемым хромосомам были только 36,2 % эмбрионов, вероятно, вследствие влияния гормональной стимуляции овуляции и природных характеристик человека. Однако, по результатам анализа морфологических показателей патологических и euploidных эмбрионов, хромосомно сбалансированные образцы чаще (65 % по сравнению с 50,4 %) формируют бластоцисты, а значит, имеют более высокий имплантационный потенциал.

Ключевые слова: преимплантационный генетический скрининг, анеуплоидии, эмбрион, донорские ооциты.

Chaplia O.V. NUMERICAL CHROMOSOMAL ANOMALIES OF EMBRYOS OBTAINED IN IVF CYCLES WITH DONOR OOCYTES / National university 'Kyiv-Mohyla academy', *Institute of Reproductive Genetics, Kyiv, Ukraine.

In order to reveal the chromosomal anomalies' influence on early development of the fertile women embryos, preimplantation genetic screening of 174 embryos obtained in oocyte donation *in vitro* fertilization cycles was held. The study showed that only 36,2 % of analyzed embryos were euploid for all 7 chromosomes investigated. Such a small number of normal embryos could be the consequence of natural human characteristics and the effect of the hormonal superovulation stimulation. According to the morphological features evaluation, euploid embryos more frequently than abnormal specimen (65 % versus 50,4%) formed blastocysts and so possessed higher implantation potential.

Key words: preimplantation genetic screening, aneuploidy, embryo, donor oocytes.

ВСТУП

Одним із вірогідних пояснень незадовільних результатів лікування безпліддя із застосуванням допоміжних репродуктивних технологій є високі рівні хромосомних аномалій (ХА), характерні преімплантаційним ембріонам [1]. ХА можуть призводити до припинення раннього розвитку та порушення процесів імплантації ембріонів у порожнині матки, а в разі настання вагітності – до розвитку плода з патологією [2]. Найбільш поширеними хромосомними аномаліями виступають анеуплоїдії 13, 18, 21 та статевих хромосом, які становлять близько 80 % генетичних порушень, що спричиняють ранню загибель плода [3]. Саме тому метою генетичної діагностики в циклах запліднення *in vitro* (ЗІВ) є відбір еуплоїдних ембріонів для наступного перенесення до порожнини матки пацієнтки. Проведення скринінгу хромосомних аномалій ембріонів у межах стандартного циклу лікування безпліддя дозволяє підвищити вірогідність настання вагітності [4] та суттєво зменшити ризик її самовільного переривання [5]. Утім, стислі терміни проведення дослідження та незначна кількість клітинного матеріалу, яку можливо вилучити без суттєвого ушкодження ембріона, виключає використання методів стандартної цитогенетики в преімплантаційних генетичних тестах. Встановити в стислі терміни кількість 5-10 хромосом у ядрі кожної вилученої клітини ембріона можливо завдяки технології флюоресцентної гібридизації *in situ*, яка зробила реальним широке впровадження в клінічну практику преімплантаційного генетичного скринінгу.

Численні дослідження показали, що з віком у жінок спостерігають поступове підвищення кількості аномальних гамет, що суттєво погіршує якісні показники отриманих при заплідненні *in vitro* ембріонів, до 80 % з яких є хромосомно незбалансованими [6]. Це пояснює формування найбільшої цільової групи для застосування преімплантативного генетичного скринінгу в циклах запліднення *in vitro* з жінок, старших за 35 років. Однак на фоні доведеної високої частоти хромосомних аномалій ембріонів пацієнток старшого репродуктивного віку, внесок ХА зниження фертильного потенціалу молодих жінок лишається невідомим. Саме тому наше дослідження присвячене встановленню частки анеуплоїдних ембріонів, отриманих при заплідненні ооцитів здорових фертильних жінок молодшого репродуктивного віку. Досягнення поставленої мети передбачало проведення преімплантативного генетичного скринінгу ембріонів, отриманих у циклах ЗІВ із використанням донорських яйцеклітин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Преімплантативний генетичний скринінг проводили на вимогу подружніх пар, що потребували лікування безпліддя методом запліднення *in vitro* із використанням донорських яйцеклітин, аби уникнути настання патологічної вагітності. Жінки, що виступали донорами яйцеклітин, були обстежені відповідно до наказу МОЗ № 711 від 23.12.2008 р. [7]. За результатами додаткового цитогенетичного дослідження лімфоцитів периферійної крові було встановлено, що всі донори ооцитів мали нормальний жіночий каріотип.

Протягом 2010-2011 рр. преімплантативний генетичний скринінг 7 хромосом було проведено на 174 ембріонах, отриманих у 17 циклах запліднення *in vitro* із донацією яйцеклітин від 16 різних донорів, віком 22-29 років (середній $26,6 \pm 3,8$ років), тоді як середній вік реципієнтів становив $43 \pm 4,2$ роки (від 28 до 48).

Запліднення зрілих ооцитів здійснювали методом інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда, успішність проведеної процедури оцінювали через 16-18 год за формуванням другого полярного тільця в перивітеліновому просторі та наявністю 2 пронуклеусів у цитоплазмі зиготи. Ембріони культивували в краплях поживного середовища (MediCult, Данія) протягом 5 діб, до моменту переносу визнаних еуплоїдними зразків до порожнини матки реципієнток.

На третій день розвитку ембріона, коли всі його клітини є тотипотентними, а отже здатними компенсувати втрачений матеріал активним поділом, один бластомер вилучали для проведення аналізу. Ядра вилучених клітин фіксували сумішшю етанолу та оцтової кислоти 3:1 [8]. Діагностику хромосомних аномалій ембріонів здійснювали методом флюоресцентної *in situ* гібридизації. Зразки денатурували при 69°C та інкубували протягом 4 год у вологій камері за температури 37°C. Постгібридаційна обробка включала промивку в 0,7xSSC/0,4% NP-40 при 73°C та 2xSSC/0,1% NP-40 при кімнатній температурі. Протокол передбачав проведення двох послідовних циклів гібридизації із: 1) набором багатоколірних проб до аутосом 13, 16, 18, 21, 22 (PB Multivysion, Vysis, США); 2) центромерними зондами до статевих хромосом X та Y (Vysis, США). Якщо чітко встановити кількість сигналів, що відповідали певній хромосомі, було неможливо, проводили додатковий раунд гібридизації з використанням проб до альтернативних локусів раніше досліджуваної хромосоми. Оцінку сигналів проводили візуально та за допомогою комп'ютерного забезпечення ISIS (MetaSystems, Німеччина) з дотриманням вимог, представлених у методичних рекомендаціях Європейської асоціації репродукції людини (2010 рік, Рим) [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У 17 циклах запліднення *in vitro* загалом було отримано 235 ооцитів (у середньому 13,8 яйцеклітин/цикл). Успішність процедури запліднення склала 93 %, оскільки 219 яйцеклітин сформували зиготу із двома пронуклеусами після введення сперматозоїда у їх цитоплазму. Серед отриманих ембріонів 20 не підлягали преімплантаційному генетичному дослідженню, оскільки припинили розвиватися до моменту проведення біопсії клітинного матеріалу. Серед 199 ембріонів, залучених до дослідження, 25 лишилися без остаточного діагнозу через: відсутність ядра у вилученій клітині ($n = 14$) чи порушення гібридизації зондів із генетичним матеріалом ($n = 11$).

За результатами проведеного скринінгу лише 36,2 % (63 зі 174) ембріонів були еуплоїдними за 7 проаналізованими хромосомами. Таким чином, частка хромосомно збалансованих ембріонів, отриманих при заплідненні донорських гамет, виявилася значно нижчою за очікувані значення і була близькою до показників ембріонів молодих неплідних жінок (60 % за даними Munne) [6]. Rubio [10] припускає, що такий високий рівень хромосомних аномалій можна пояснити використанням у циклах ЗІВ із донацією гамет більш інтенсивної гормональної стимуляції з метою гарантованого отримання значної кількості яйцеклітин. Із метою нівелювання можливого негативного впливу високих доз гормонів на розвиток ембріонів, автори рекомендували застосовувати «м'які» схеми стимуляції суперовуляції, особливо в жінок із високим фолікулярним резервом. У нашому дослідженні застосовували стандартні протоколи стимуляції, однак середня кількість вилучених ооцитів не перевищувала 14,7, отриманих згаданими авторами при застосуванні рекомендованих «м'якших» протоколів. При цьому було виявлено слабкий зворотній зв'язок ($r = -0,33$) між кількістю отриманих при пункції фолікулів ооцитів та часткою еуплоїдних ембріонів у конкретному циклі лікування, що підтверджує висновки Rubio та Nelson [10, 11]. Утім, з урахуванням відносно невеликої кількості вилучених у кожному циклі ооцитів, можна також припустити, що на преімплантаційному етапі розвитку висока частота хромосомно незбалансованих ембріонів притаманна навіть молодим, фізично здоровим жінкам. Вірогідно, це є природною особливістю людини, що зумовлює її відносно низький фертильний потенціал [12]. У такому разі частка хромосомних аномалій знижується до 0,5-0,7 %, зареєстрованих у новонароджених дітей [13], за рахунок елімінації аномальних ембріонів до чи невдовзі після імплантації останніх у порожнині матки.

У той же час, 111 (63,8 %) досліджених ембріонів були визнані хромосомно незбалансованими і не підлягали наступному перенесенню до порожнини матки реципієнтів. Виявлені кількісні порушення хромосом були умовно класифіковані на:

- 1) ізольовану нестачу хромосом (моно- чи нулісомія певної хромосоми);
- 2) ізольовану полісомію (присутність додаткової хромосоми певної пари);
- 3) комплексну хромосомну патологію (порушення кількості ≥ 2 пар хромосом);
- 4) порушення рівня плідності (кратне зменшення чи збільшення кількості усіх досліджуваних хромосом).

Аналіз виявлених хромосомних порушень (табл. 1) показав, що серед патологічних ембріонів превалювала комплексні ХА (54 % незбалансованих зразків), найвагомішу частину якої становила одночасна втрата гомологів різних хромосом. У 54 % випадків задіяними в такому типі дисбалансу були 2 хромосоми, тоді як аномалії 3-х хромосом було виявлено в 38 % ембріонів із комплексними хромосомними аномаліями. Ембріони із комбінованими аномаліями можуть формуватися в результаті порушення регуляції реплікації та сегрегації хромосом у мітозі, що в більшості випадків є несумісним із подальшим розвитком організму.

Ембріони, що характеризувалися ізольованими втратою чи набуттям окремих хромосом, становили третину аномальних зразків (табл. 1). Слід зазначити, що 32 % ізольованих полісомій припадали на трисомію хромосоми 21, що в півтора раза переважає теоретично очікувану частоту (за умови однакової вірогідності виникнення полісомій окремих аутосом). Ймовірно, навіть за умови молодого віку батьків, існує певна схильність до формування ембріонів із трисомією 21, а отже, існує і вища вірогідність їх імплантації у порожнині матки порівняно з іншими анеуплоїдними ембріонами. Крім того, ще 10 % аномальних ембріонів характеризувалися порушеннями рівня плідності, що в переважній більшості (9 з 11 зразків) було зумовлене блоком сингамії та втратою батьківського пронуклеуса з наступним формуванням гаплоїдного хромосомного набору ембріона.

Таблиця 1 – Розподіл анеуплоїдних ембріонів за типом виявленого хромосомного дисбалансу

Кількісні показники	Ізольована моносомія	Ізольована полісомія	Комплексна хромосомна аномалія	Порушення рівня плідності
Кількість ембріонів із відповідним порушенням	18	22	60	11
Відносна частка ембріонів із визначеною аномалією серед патологічних зразків (n=111), %	16,3	19,8	54,0	9,9

Крім того, 30 ембріонам були притаманні патології статевих хромосом, до яких належали як моно- ($X_$, $Y_$), так і полісомії (XXX, ХХУ, ХУУ, ХХУУ). Найбільшу частину патологій статевих хромосом становила моносомія X, що складала 53,3 % виявлених у цій групі аномалій. Серед зразків, диплоїдних за статевими хромосомами (n=134), співвідношення ембріонів чоловічої та жіночої статі становило 44,0 та 56,0 % відповідно. Аналогічне співвідношення статей (0,45:0,55) зберігалось і серед ембріонів, визнаних еуплоїдними за всіма досліджуваними хромосомами.

Із метою опосередкованої оцінки імплантаційного потенціалу еуплоїдних та хромосомно незбалансованих ембріонів молодих жінок оцінювали частоту формування бластоцист серед проаналізованих зразків (рис.1) [14]. Цей етап диференціації ембріональних клітин вимагає успішної активації власне ембріонального геному, а тому може виступати індикатором нормальної реалізації процесів раннього розвитку [14]. Було показано, що частота бластуляції в групі хромосомно збалансованих зразків становила 65 % і була достовірно вищою ($p < 0,05$) за відповідні показники патологічної групи, у якій стадії бластоцисти досягли 50,4 % ембріонів. Таке співвідношення дозволяє припустити, що аномалії хромосомного набору, особливо комбінована хромосомна патологія, призводять до серйозних порушень процесів раннього розвитку ембріонів людини ще до моменту виокремлення ембріобласту.

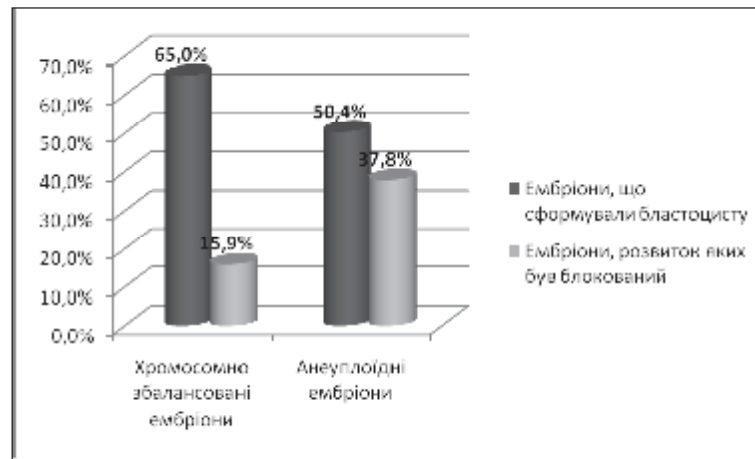


Рис.1. Співвідношення ембріонів із високим та зниженим імплантаційним потенціалом у групах хромосомно збалансованих та анеуплоїдних ембріонів.

Крім того, у патологічній групі спостерігалось двократне (37,8 проти 15,9%), порівняно із показниками еуплоїдних зразків, збільшення частки ембріонів, що припинили розвиватися ще до моменту формування бластоцелі. Варто зазначити, що серед ембріонів, розвиток яких припинився ще на стадії морули, превалювали зразки із комбінованою хромосомною патологією (65,8 % групи). Отримані дані дозволили підтвердити припущення про ранню дію природного добору проти анеуплоїдних ембріонів людини, що, зважаючи на високу частоту формування незбалансованих ембріонів, призводить до зниження вірогідності настання вагітності в кожному окремому природному та стимульованому циклі овуляції.

Отримані дані дозволяють припустити, що проведення молекулярно-цитогенетичної діагностики в циклах запліднення *in vitro* в жінок молодшого репродуктивного віку і навіть у циклах із використанням донорських ооцитів, ймовірно, дозволило б підвищити вірогідність настання вагітності без збільшення кількості перенесених до порожнини матки ембріонів. Окрім того, перспективи подальшого дослідження включають аналіз хромосомного компонента полярних тілець донорських ооцитів для встановлення частоти мейотичних помилок, що виникають при формуванні та дозріванні гамет молодих жінок. Подібне дослідження дозволило б виокремити батьківський вплив і оцінити роль мітозу у формуванні частоти та спектра хромосомних аномалій ембріонів жінок молодшого репродуктивного віку.

ВИСНОВКИ

Отримані нами дані доводять, що близько 60 % преімплантаційних ембріонів жінок молодшого репродуктивного віку анеуплоїдні, що, вірогідно, є сукупним наслідком гормональної стимуляції суперовуляції та природних особливостей людини, що

зумовлюють її низький репродуктивний потенціал. Отже, проведення молекулярно-цитогенетичної діагностики преімплантаційних ембріонів у циклах запліднення *in vitro* з донацією ооцитів дозволить не тільки попередити настання вагітності патологічним плодом, але й підвищити ефективність лікування безпліддя в цілому.

ЛІТЕРАТУРА

1. Current value of preimplantation genetic aneuploidy screening in IVF / [Donoso P., Staessen C., Fauser B. C., Devroey P.] // Hum. Reprod. Update. – 2007. – V. 13, № 1 – P. 15–25.
2. Role of aneuploidy in embryo implantation / [Farfalli V. I., Magli M. C., Ferraretti A. P. et al.] // Gynecol. Obstet. Invest. – 2007. – V. 64. – P. 161–165.
3. Rapid screening for chromosomal aneuploidies using array-MLPA / [Yan J. B., Xu M., Xiong C. et al.] // BMC Med. Genet. – 2011. – V. 7, № 12. – P. 68–73.
4. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed / [Gianaroli L., Magli M. C., Ferraretti A. P., Munné S.] // Fertility and Sterility. – 1999. – № 72. – P. 837–844.
5. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women 35 and older with a history of recurrent miscarriages / [Munné S., Chen S., Fischer J. et al.] // Fertility and Sterility – 2005. – V. 84. – P. 331–335.
6. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos / [Munné S., Chen S., Colls P. et al.] // Reproductive BioMedicine Online. – 2007. – № 14. – P. 628–634.
7. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 23.12.2008 № 771 про затвердження Інструкції про порядок застосування допоміжних репродуктивних технологій. – <http://news.yurist-online.com/laws/3192>. – 12.05.2007.
8. Establishment of a simple and useful way for preimplantation genetic diagnosis of chromosomal diseases / [Luo H., Zhu G., Liu Q., Chen W. et al.] // J. Huazhong. Univ. Sci. Technol. Med. Sci. – 2007. – V. 27, № 3. – P. 315–317.
9. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)' / [Thornhill A. R., deDie-Smulders C. E., Geraedts J. P. et al.] // Hum. Reprod. – 2005. – V. 20, № 1. – P. 35–48.
10. Prospective cohort study in high responder oocyte donors using two hormonal stimulation protocols: impact on embryo aneuploidy and development / [Rubio C., Mercader A., Alamá P. et al.] // Hum. Reprod. – 2010. – V. 25, № 9. – P. 2290–2297.
11. Preimplantation genetic diagnosis in embryos created from oocytes donation / [Nelson J. R., Potter D. A., Wilcox J. G. et al.] // Fertil. Steril. – 2005. – V. 84 (Suppl.1). – P. 492–498.
12. Delhanty J. D. A. Preimplantation genetics: an explanation for poor human fertility? / J. D. A. Delhanty // Annals of human genetics. – 2001. – V. 65. – P. 331–338.
13. Nielsen J. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark / J. Nielsen, M. Wohlert // Human genetics. – 1991. – V. 87, № 1. – P.81-83.
14. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? Experience with blastocyst biopsy and testing for aneuploidy / [Jansen R. P. S., Bowman M. C., de Boer K. A. et al.] // Hum. Reprod. – 2008. – V. 23, № 7. – P. 1476–1478.