

## ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ЭМБРИОНОВ ПРИ РЕЦИДИВИРУЮЩИХ НЕУДАЧАХ ИМПЛАНТАЦИИ В ЦИКЛАХ ЭКО

Зверко Н. Л., Жуковская С. В.

Белорусский государственный медицинский университет,  
кафедра акушерства и гинекологии, г. Минск

**Ключевые слова:** экстракорпоральное оплодотворение, рецидивирующие неудачи имплантации, хромосомные аномалии.

**Резюме:** в статье представлены результаты предимплантационного генетического скрининга эмбрионов методом секвенирования нового поколения. Проведена оценка количества полученных эмбрионов, процента их развития до стадии бластоцисты, наличия хромосомных аномалий и их качественный состав в различных возрастных группах пациенток.

**Resume:** the results of pre-implantation genetic screening of embryos via next generation sequencing are demonstrated in this article. The number of obtained embryos, the percentage of their development to the blastocyst stage, the presence of chromosomal abnormalities and their qualitative composition in different age groups of patients have been evaluated.

**Актуальность.** В настоящее время бесплодие является одной из наиболее социально значимых проблем медицины и общества в целом. По данным Национальной ассоциации по проблемам бесплодия США за 2018 год, с такой проблемой сталкивается одна из восьми женщин репродуктивного возраста, в то время как 12% замужних женщин имеют проблемы с наступлением или вынашиванием беременности [3]. С целью преодоления различных форм бесплодия применяются вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), в том числе экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО). Эффективность ЭКО варьирует в разных клиниках и зависит от репродуктивного здоровья и возраста половых партнеров, сопутствующих заболеваний и технической составляющей процедуры. Так, по данным Центров по контролю и профилактике заболеваний (Centers for Disease Control and Prevention) за 2015 год, эффективность процедуры ЭКО варьировала от 31% у женщин в возрасте до 35 лет до 3% у женщин старше 44 лет [4].

Неудачи имплантации являются значимой проблемой ВРТ, особенно в случаях неоднократных попыток ЭКО. Для их обозначения был введен термин рецидивирующие неудачи имплантации (РНИ). РНИ – это 3 и более попытки ЭКО в анамнезе с переносом бластоцист хорошего качества, не завершившиеся наступлением клинической беременности [5]. Исследователи Bashiri et al. (2018) выделяют следующие факторы риска РНИ в программах ЭКО: возраст матери 35 лет и более, индекс массы тела более 25 кг/м<sup>2</sup>, курение, стресс, различные иммунологические механизмы (в том числе антифосфолипидный синдром и наследственные тромбофилии), инфекции, анатомические и функциональные аномалии матки и эндометрия, а также генетические факторы. На долю последних приходится около 2% среди пациенток с РНИ [2]. Однако при исключении всех возможных корригируемых факторов, хромосомные аномалии играют важную роль как при РНИ, так и при ранних самопроизвольных выкидышах.

С целью выявления хромосомных аномалий эмбрионов проводится предимплантационный генетический скрининг (ПГС). Существуют различные методы его проведения, такие как метод Сэнджера, FISH-анализ, а также метод секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS). Последний, в отличие от своих предшественников, позволяет достигнуть большей глубины исследования и точности выявления нарушений ДНК.

**Цель:** изучить роль генетических факторов в идиопатических рецидивирующих неудачах имплантации у женщин в программах экстракорпорального оплодотворения.

**Задачи:** 1. Выявить взаимосвязь количества полученных эмбрионов, частоты их развития до стадии бластоцисты с возрастом пациенток; 2. Оценить частоту развития и характер хромосомных аномалий эмбрионов у женщин разных возрастных групп методом NGS.

**Материал и методы исследования.** Исследование проводится на базе МЧУП «Центр репродуктивной медицины» (г. Минск, Беларусь) в 2019-2020 гг. и является проспективным.

Для обработки данных использовалась персональная ЭВМ со следующим программным обеспечением: Microsoft Office Excel 2013, надстройка Attestat для Excel.

Объектом исследования стали женщины с тремя и более попытками ЭКО в анамнезе (n=83). Все женщины и их супруги были включены в исследование при наличии медицинских показаний и отсутствии противопоказаний к применению ВРТ в соответствии с Приложением 1 Постановления Министерства здравоохранения Республики Беларусь №54 от 01.06.2012 г., а также обследованы в соответствии с Инструкцией о порядке проведения медицинского осмотра пациента, в отношении которого предполагается применение вспомогательных репродуктивных технологий, утвержденной Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 01.06.2012 № 54. [1]. Критериями включения в исследование было отсутствие всех возможных диагностируемых и корригируемых факторов, негативно влияющих на исходы имплантации. Так, с целью выявления инфекций, передаваемых половым путём, использовался метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Вероятные эндокринные нарушения, способные негативно повлиять на имплантацию эмбриона, исключены путём определения гормонального профиля: измеряли концентрацию в сыворотке крови фолликулостимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона, антимюллера гормона, тиреотропного гормона, пролактина, свободного тироксина, антител к тиреопероксидазе, общего и свободного тестостерона, инсулина и лептина, эстрадиола и прогестерона, кортизола. Исследования проводились с использованием хемилюминесцентного метода, использован анализатор иммунохимический Cobas e411 (Япония); реагенты – Roche Diagnostics (Германия). С целью исключения хронического эндометрита всем пациенткам проводилась аспирационная биопсия эндометрия с последующим иммуногистохимическим исследованием для поиска маркеров плазматических клеток – CD138. Также всем женщинам исследуемой группы и их супругам проводилось кариотипирование – результаты в пределах нормы.

Предметом исследования стали результаты ПГС эмбрионов методом NGS. Эмбрионы были получены в результате проведения исследуемым пациенткам процедуры ЭКО, включавшей следующие основные этапы: контролируемая овариальная стимуляция с использованием блокады гипофиза агонистами гонадотропин-рилизинг гормона, контролируемой гормональной стимуляции гонадотропинами и введением хорионического гонадотропина человека за 36 часов до аспирации фолликулярной жидкости; трансвагинальная аспирация фолликулярной жидкости под ультразвуковым контролем; оплодотворение яйцеклеток методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ICSI); культивация эмбрионов в средах для культивирования фирмы «ORIGIO» (Дания). Оценка качества 3-дневных эмбрионов осуществлялась по уровню роста и степени фрагментации цитоплазмы. Выделение эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты, проводилось на 5-е сутки с последующим отбором эмбрионов хорошего качества по уровню расширения бластоцеле, качеству эмбриобласта и качеству трофобласта.

Предимплантационный генетический скрининг эмбрионов проводился методом NGS, забор материала осуществлялся путём биопсии трофэктодермы эмбрионов. Эмбрионы подвергались криоконсервации с последующим хранением в сосудах с жидким азотом. Женщинам выполнялась пересадка генетически нормальных и качественных эмбрионов.

Выборка была разделена на две группы по возрастному критерию: в группу №1 вошли женщины до 35 лет (n=15), группу №2 составили женщины 35 лет и старше (n=68). В обеих исследуемых группах распределение данных было отличным от нормального (определение при помощи одномерных методов), следовательно, использовались непараметрические методы статистического анализа (расчёт медианы с определением верхнего и нижнего квартилей).

**Результаты исследования и их обсуждение.** Медиана возраста в группе №1, до 35 лет (n=15) составила 31 [29;32], min=28, max=32. Получено 85 эмбрионов (среднее количество эмбрионов на одну пациентку – 5,7), из них развились до стадии бластоцисты – 33. Таким образом, процент развития эмбрионов до стадии бластоцисты в группе пациенток до 35 лет составил 38,8%. Результаты предимплантационного генетического скрининга 33 полученных бластоцист представлены на рисунке 1.



Рис. 1 – Процентное соотношение нормальных и аномальных бластоцист в группе №1

Как видно на рисунке 1, доля нормальных бластоцист в первой группе

составила 45,5% (n=15), в то время как на долю аномальных пришлось 54,5% (n=18). Наиболее часто встречающимися аномалиями в группе пациенток до 35 лет оказались единичные моносомии (12,1%), единичный мозаицизм (12,1%), а также множественные анеуплоидии (9,1%).

Медиана возраста в группе №2, 35 лет и старше (n=68) – 39,5 [38;42], min=38, max=48. Получено 272 эмбриона (в среднем, 4 эмбриона на одну женщину), из них развились до стадии бластоцисты 70 эмбрионов, что составило 25,7%. Методом NGS были получены результаты, представленные на рисунке 2.



Рис. 2 – Процентное соотношение нормальных и аномальных бластоцист в группе №2

Исходя из данных, приведенных на рисунке 2, процент нормальных бластоцист в группе пациенток 35 лет и старше составил всего 20%. Наиболее часто встречающимися аномалиями в группе пациенток до 35 лет оказались единичные моносомии (21,4%), единичный мозаицизм (17,1%), а также множественные анеуплоидии (17,1%).

Пример проведения секвенирования нового поколения с получением результата «множественные анеуплоидии» представлен на рисунке 3.

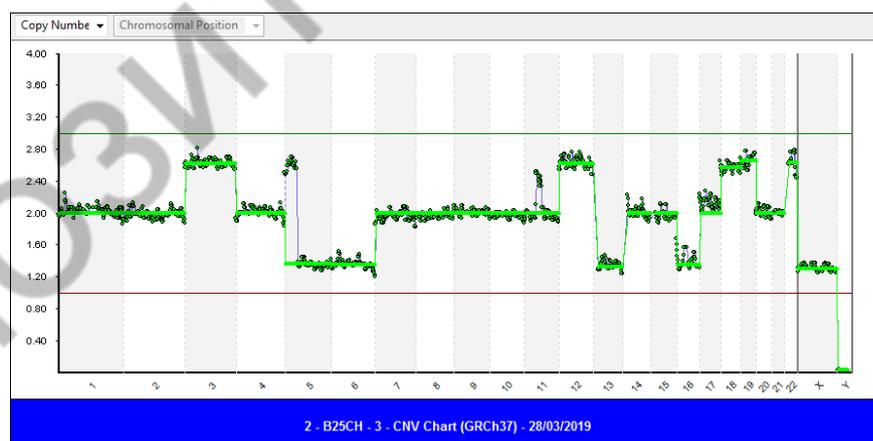


Рис. 3 – Эмбрион женского пола с множественными анеуплоидиями по результатам NGS

Для сравнения нормальный результат проведенного исследования методом NGS представлен на рисунке 4.

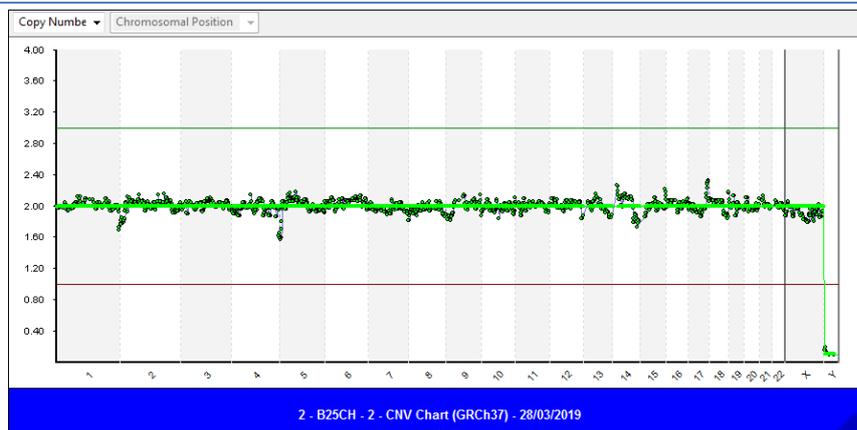


Рис. 4 – Эмбрион женского пола без выявленной генетической патологии при NGS

При сравнительном анализе количества полученных бластоцист в возрастных группах было выявлено, что в группе пациенток 35 лет и старше до стадии бластоцисты развилось в 1,5 раза меньше эмбрионов, чем в группе женщин до 35 лет ( $\chi^2$  3,98;  $p=0,04$ ).

Кроме того, при сравнительном анализе количества нормальных и аномальных бластоцист в исследуемых группах стало очевидным, что доля нормальных бластоцист в группе пациенток 35 лет и старше в 2,3 раза меньше, чем в группе пациенток до 35 лет ( $\chi^2$  5,98;  $p=0,01$ ). Это, в первую очередь, связано с накоплением хромосомных нарушений в ооцитах женщин более старших возрастов.

На данный момент проведено 9 переносов в полость матки эмбрионов с исключенными генетическими аномалиями, в результате которых наступило 6 (66,7%) беременностей. 2 беременности уже завершились срочными родами, у новорожденных отсутствует генетическая патология.

#### Выводы:

1. Количество получаемых эмбрионов уменьшается с увеличением возраста пациенток: 5,7 в сравнении с 4 эмбрионами в среднем на одну пациентку в первой и второй группах соответственно;
2. Возраст пациенток 35 лет и старше характеризуется меньшей способностью полученных эмбрионов развиться до стадии бластоцисты (в 1,5 раза меньше, чем в группе до 35 лет);
3. Доля нормальных бластоцист уменьшается с увеличением возраста пациенток (в 2,3 раза меньше в группе 35 лет и старше в сравнении с группой моложе 35 лет).
4. Наиболее часто встречающимися хромосомными аномалиями бластоцист у пациенток обеих возрастных групп являются единичные моносомии (12,1%/21,4%), единичный мозаицизм (12,1%/17,1%), а также множественные анеуплоидии (9,1%/17,1%). Самыми редкими хромосомными аномалиями являются моносомии 2 - 4 хромосом и комплексный мозаицизм – 0% и 2,9% в первой и второй группах соответственно.

#### Литература

1. Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь №54 от 01.06.2012 [Электронный ресурс]: Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь

15.08.2012, 8/26260. – Режим доступа: [https://pravo.by/upload/docs/op/W21226260\\_1344978000.pdf](https://pravo.by/upload/docs/op/W21226260_1344978000.pdf) (дата обращения: 29.09.2020).

2. Bashiri, A. Recurrent Implantation Failure – update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions / Bashiri A., Halper K. I., Orvieto R. // *Reproductive Biology And Endocrinology*. – 2018. – Т. 16.

3. How many people have infertility? [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://resolve.org/how-many-people-have-infertility/> (дата обращения: 23.08.2020).

4, 3. Infertility / *Reproductive Health / CDC* [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/reproductivehealth/infertility/index.htm> (дата обращения: 26.08.2020).

5. Timeva T. Recurrent Implantation Failure: The Role of the Endometrium / Timeva T., Shterev A., Kyurkchiev S. // *Journal of Reproduction & Infertility*. – 2014. – Т.15. – №4. – P. 173 – 183.

Репозиторий БГМУ