

Н. Л. Зверко

**РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ЭТИОЛОГИИ
РЕЦИДИВИРУЮЩИХ НЕУДАЧ ИМПЛАНТАЦИИ В ПРОГРАММАХ
ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ**

Научный руководитель ассист. С. В. Жуковская

Кафедра акушерства и гинекологии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

N. L. Zverko

**THE ROLE OF GENETIC FACTORS IN ETIOLOGY OF RECURRENT
IMPLANTATION FAILURE IN PROGRAMS OF IN VITRO FERTILIZATION**

Tutor assistant S. V. Zhukovskaya

Department of Obstetrics and Gynecology,

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. В статье представлены результаты предимплантационного генетического скрининга эмбрионов у женщин разных возрастных групп с идиопатическими рецидивирующими неудачами имплантации. Наиболее часто встречающиеся хромосомные аномалии – единичные моносомии, мозаицизм, а также множественные анеуплоидии. Также отмечено, что частота развития эмбрионов до стадии бластоцисты снижался с увеличением возраста пациенток.

Ключевые слова: рецидивирующие неудачи имплантации, секвенирование нового поколения.

Resume. This article presents the results of preimplantation genetic screening of embryos from women of different age groups with idiopathic recurrent implantation failure. The most common chromosomal abnormalities are single monosomies, mosaicism and multiple aneuploidies. The percentage of embryos successfully developing to blastocyst stage was also evaluated – it decreased in correspondence with the increase of female age.

Keywords: recurrent implantation failure, next generation sequencing.

Актуальность. В настоящее время нет общепринятого определения понятия рецидивирующих неудач имплантации (РНИ). По данным Coughlan et al., 2014 рецидивирующими неудачами имплантации принято считать отсутствие наступления клинической беременности при переносе хотя бы четырех эмбрионов хорошего качества как минимум в трех циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) (с криоконсервацией или без) у женщин в возрасте до 40 лет [5]. Существуют дефиниции и без уточнения количества перенесенных эмбрионов и возраста матери. Так, Bashiri et al., 2018 считают, что РНИ можно назвать 3 и более попыток ЭКО в анамнезе с переносом бластоцист хорошего качества, не завершившихся наступлением клинической беременности [6]. Отбор бластоцист хорошего качества осуществляется на 5-е сутки по трем критериям: уровень расширения бластоцеле по мере роста, качество эмбриобласта, качество трофобласта [5]. Клинической называют беременность, визуализированную с помощью УЗИ.

По некоторым оценкам РНИ ожидает примерно 10% женщин, преодолевающих бесплодие с помощью программ ЭКО, что делает эту проблему актуальной в сфере вспомогательных репродуктивных технологий. Такой прогноз объясняется тем, что возможность успешной имплантации эмбриона в программах ЭКО состав-

ляет 30%, в то время как неудачи встречаются в 70% случаев. Тем не менее с увеличением количества переносимых эмбрионов увеличивается и вероятность успеха [5].

Существует множество факторов, влияющих на исходы ЭКО. Известно, что на неудачи имплантации влияют: возраст матери (35 лет и старше), индекс массы тела более 25 кг/м², курение, стресс, различные иммунологические механизмы (в том числе антифосфолипидный синдром и наследственные тромбофилии), инфекции, анатомические и функциональные аномалии матки и эндометрия, а также генетические аномалии [6]. При исключении вышеназванных факторов рецидивирующие неудачи имплантации можно считать идиопатическими.

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

Задачи:

1. Оценить частоту развития эмбрионов до стадии бластоцисты у женщин разных возрастных групп (до 35 лет и старше).
2. Выявить долю хромосомных аномалий эмбрионов в идиопатических РНИ у женщин при исключении иных причин, влияющих на исходы имплантации.
3. Изучить наиболее часто встречающиеся хромосомные аномалии эмбрионов и их связь с возрастом женщин.

Материал и методы. Проведено проспективное исследование на базе МЧУП «Центр репродуктивной медицины» (г. Минск, Беларусь) в 2019-2020 гг. Выборку составили 83 женщины с рецидивирующими неудачами ЭКО. У всех исследуемых пациенток были исключены факторы, влияющие на неудачи имплантации.

Выделены 2 группы: группа №1 (n=15) – женщины до 35 лет (медиана возраста 30 [29;32] лет); группа №2 (n=68) – женщины 35 лет и старше (медиана возраста 39,5 [38;42] лет).

Известно, что возраст женщины старше 35 лет считается риском неудач имплантации. В исследовании, проведенном Forman et al., 2013 указывается, что бластоцисты, отобранные для переноса по морфологическим критериям, оказались эуплоидными в 86% случаев у пациенток до 35 лет и в 69% случаев у пациенток от 35 до 44 лет. Несмотря на то, что это различие является клинически важным, на успех имплантации влияет также множество факторов, ассоциированных с возрастом [3]. В исследовании, проведенном с участием 1169 пациенток, которым переносили некриоконсервированные аутологичные бластоцисты, сравнивали различные параметры, влияющие на исходы имплантации в группах пациенток до 35 лет и старше (Sharigo et al., 2016). Было выявлено значительное снижение количества полученных ооцитов ($p < 0,001$), снижение доли синхронных переносов ($p < 0,0001$), снижения частоты созревания эмбрионов до стадии бластоцист ($p < 0,001$), толщины эндометрия ($p = 0,0093$), параметров эмбриоморфометрии: диаметр бластоцист ($p = 0,0052$), эмбриобласта (inner cell mass) ($p < 0,001$), трофэктодермы ($p < 0,001$) в группе пациенток старше 35 лет в сравнении с группой женщин до 35 лет; выявлено также значительное увеличение продолжительности стимуляции яичников ($p = 0,0063$), суммарной дозы экзогенного ФСГ ($p < 0,001$), доли переносов с повышенным уровнем прогестерона ($p = 0,0215$) а также доли переноса 6-дневных эмбрионов ($p < 0,001$) в старшей возрастной группе в сравнении с младшей. Общее число

перенесенных бластоцист значимо не отличалось в обеих группах [8]. Тем не менее, в программах ЭКО возраст пациенток является не только некорректируемым фактором, но и часто встречающимся явлением. Поэтому необходимо разработать оптимальный подход преодоления РНИ, ассоциированных с возрастом пациенток.

У всех исследуемых нами женщин методом полимеразной цепной реакции были исключены инфекции, передаваемые половым путем (ИППП). Известно, что ИППП играют роль не только в развитии хронического эндометрита, тем самым влияя на рецептивность эндометрия, но и в развитии спаечного процесса органов малого таза.

В овуляторном цикле рецептивность эндометрия достигается при последовательном воздействии на него половых стероидов. Эстроген способствует пролиферации эндометрия и модулирует рецепторы к прогестерону; прогестерон в свою очередь является неотъемлемым компонентом для успешной имплантации и наступления беременности [7]. В нашем исследовании эндокринные нарушения, способные повлиять на исходы имплантации, были исключены путем определения концентрации 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 на основании 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. Хронический эндометрит встречается примерно у 30% пациенток с РНИ в программах ЭКО, у 30% пациенток с бесплодием и у 12% пациенток с идиопатическими повторными выкидышами [1]. Патогенетические механизмы также объясняются нарушением рецептивности эндометрия.

Также всем женщинам исследуемой выборки и их супругам проводилось кариотипирование лимфоцитов периферической крови – результаты в пределах нормы.

Затем всем пациенткам была проведена процедура ЭКО, которая включала контролируемую гормональную стимуляцию гонадотропинами, трансвагинальную пункцию фолликулярной жидкости под УЗ-контролем, оплодотворение яйцеклеток методом ICSI (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоидов), культивацию эмбрионов. Преинкубация, оплодотворение ооцитов, а также культивирование эмбрионов осуществлялись в средах для культивирования фирмы «ORIGIO» (Дания).

Затем проводился предимплантационный генетический скрининг методом NGS, материал для исследования получен путем биопсии трофобласта эмбрионов. Эмбрионы подвергались криоконсервации с последующим хранением в сосудах с жидким азотом.

Результаты и их обсуждение. В первой группе пациенток (n=15) было 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.

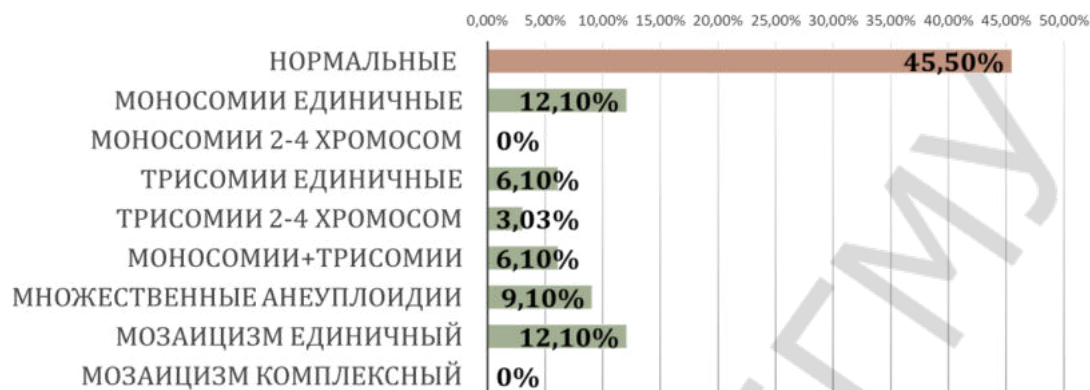


Рис. 1 – Процентное соотношение нормальных и аномальных бластоцист, полученных в группе №1

Как видно на рисунке 1, доля нормальных бластоцист в первой группе составила 45,5%, в то время как на долю аномальных пришлось 54,5%. 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%).

Во второй группе пациенток (n=68) было получено 272 эмбриона (в среднем, 4 эмбриона на одну женщину), из них развились до стадии бластоцисты 70 эмбрионов, что составило 25,7% – в 1,5 раза меньше, чем в группе пациенток до 35 лет (χ^2 3,98; p=0,04). Методом NGS были получены результаты, представленные на рисунке 2.



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

Исходя из данных, приведенных на рисунке 2, процент нормальных бластоцист в группе пациенток 35 лет и старше составил всего 20%, что в 2,3 раза меньше, чем в группе пациенток до 35 лет (χ^2 5,98; p=0,01). 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%).

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. Необходимость в генетическом скрининге таких новорожденных диктуется возможностью наличия мозаицизма эмбрионов. Нормальные результаты биопсии трофэктодермы эмбрионов не гарантируют эуплоидность эмбриобласта (inner cell mass). Поэтому рекомендуется отслеживать исходы таких беременностей, особенно в ситуациях с переносом мозаичных эмбрионов. NGS и другие методы анализа данных могут в некоторых эмбрионах неверно указывать на мозаичность в результате различных технических особенностей [2]. Еще 4 беременности на момент написания статьи пролонгируются, исследование продолжается.

Выводы:

1 Процент развития эмбрионов до стадии бластоцисты в программах ЭКО значительно снижается с увеличением возраста пациенток: 38,8% в группе до 35 лет в сравнении с 25,7% в группе старше 35 лет ($\chi^2 3,98$; $p=0,04$).

2 Генетический фактор вносит значительный вклад в исходы ЭКО у пациенток с идиопатическими рецидивирующими неудачами и составляет 54,5% у пациенток до 35 лет и 80% у пациенток старше 35 лет ($\chi^2 5,98$; $p=0,01$). Важно отметить, что столь высокий процент выявления генетических причин РНИ обусловлен тщательным отбором исследуемых женщин и исключением иных наиболее частых причин нарушений имплантации.

3 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. Пономаренко, К. Ю. Рецептивность эндометрия у женщин с нарушениями в репродуктивной системе / К. Ю. Пономаренко // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т. 66. – №4. – С. 90 – 97.
2. Рекомендации PGDIS по переносу мозаичных эмбрионов при преимплантационном генетическом тестировании на анеуплоидии (ПГТ-А) / D. S. Cram, D. Leigh, A. Handyside et al. // 18-ая международная конференция по предимплантационной генетике. – Женева, Швейцария, 15 – 18 апреля 2019 года. – 8 с.
3. Comprehensive chromosome screening alters traditional morphology-based embryo selection: a prospective study of 100 consecutive cycles of planned fresh euploid blastocyst transfer / E. J. Forman, K. M. Upham, M. Cheng et al. // Fertility and Sterility. – 2013. – Т. 100. – № 3. – P. 718 – 724.
4. Embryo grading: the good, the poor, and the baby making kind [Электронный ресурс]: ORM FERTILITY. – режим доступа: <https://ormfertility.com/fertility/embryo-grading/>
5. Recurrent implantation failure: definition and management / C. Coughlan, W. Ledger, Q. Wang et al. // Reproductive BioMedicine Online. – 2014. – Т. 28. – № 1. – P. 14 – 38.
6. Recurrent Implantation Failure – update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions / A. Bashiri, K. I. Halper, R. Orvieto et al. // Reprod Biol Endocrinol. – 2018. – Т. 16. – P. 1 – 18.

7. Teh, W.-T., What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure? / W.-T. Teh, J. McBain, P. Rogers // J Assist Reprod Genet. – 2016. – Т. 33. – № 11. – P. 1419 – 1430.

8. The risk of embryo-endometrium asynchrony increases with maternal age after ovarian stimulation and IVF / B.S. Shapiro, S. T. Daneshmand, J. Desai et al. // Reprod. Biomed. Online. – 2016. – Т. 33. – № 1. – P. 50 – 55.

РЕПОЗИТОРИЙ БГМУ