

УДК 618.177(574)

С.Б. БАЙКОШАРОВА, А.А. БЕИСОВА, М.К. ОТАРБАЕВ, С.Е. РУДЬ

## ПЕРВЫЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ В КАЗАХСТАНЕ

(Клиника экстракорпорального оплодотворения «Экомед», г. Алматы)

Приведены данные исследования, полученные в результате внедрения впервые в Казахстане метода предимплантационной генетической диагностики (ПГД). В группе исследуемых были 71 женщина, проходивших программу экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). ПГД проводилось методом FISH (Fluorescence in situ hybridization). При проведении FISH-диагностики была установлена зависимость частоты встречаемости анеуплоидий от некоторых физиологических факторов. По итогам исследования была выявлена связь между возрастом женщины и анеуплоидными aberrациями, а также влияние отягощенности репродуктивного анамнеза на их частоту. Сделан вывод о целесообразности применения FISH-диагностики для снижения репродуктивных потерь в программе ЭКО, у женщин старшего репродуктивного возраста и женщин с невынашиванием беременности.

**Ключевые слова:** ЭКО, предимплантационная генетическая диагностика, FISH-анализ, анеуплоидные aberrации.

Одним из наиболее важных достижений репродуктивной медицины и биологии является предимплантационная генетическая диагностика (ПГД). ПГД позволяет провести генетическое тестирование эмбриона, т.е. дает возможность выявить хромосомные патологии еще до переноса его в полость матки и тем самым предупредить рождение детей с генетическими заболеваниями. Данная методика проводится в рамках программы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и позволяет переносить в полость матки «здоровые» эмбрионы, у которых не выявлено тех генетических заболеваний, для обнаружения которых эта диагностика проводилась.

ПГД была разработана в конце 80-х годов как метод диагностики эмбриона на ранней стадии, призванный помочь супружеским парам, имеющим повышенный риск передачи наследственного заболевания своему ребенку [1,2,3]. Еще в 1967 году R. Edwards и R. Gardner впервые применили в клинической практике метод ПГД для определения пола у эмбрионов кролика [4]. Уже тогда появились идеи применения ПГД у человека в целях исключения передачи генетических заболеваний.

В начале 90-х г. была разработана техника полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая позволила определить мутации в единичных клетках [5]. Первыми ПЦР у человека для ПГД

применил A. Handyside с соавторами, с помощью ПЦР они определяли специфические последовательности нуклеотидов, характеризующие Y – хромосому, в целях определения пола эмбрионов у супружеских пар с X – сцепленными заболеваниями [6].

Однако, из-за риска постановки неправильного диагноза при определении эмбрионов, от ПЦР постепенно стали отказываться в пользу другого метода – флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Его преимущество в том, что можно было одновременно детектировать как X-, так Y – хромосомы, и так появилась возможность определять не только пол эмбрионов, но и анеуплоидии половых хромосом [7]. Одно из важных моментов – то, что в мировой практике нет абсолютно 100% надежных и достоверных методов диагностики. Методика ПГД достоверна в 97-98% случаев. Также второй самый важный момент – ПГД не повышает риска врожденных пороков развития, который остается таким же, как и у всех людей - 2-3% [8]. FISH – анализ позволяет выявлять несколько аномальных клеток среди тысяч клеток с нормальным генотипом. Основные преимущества FISH – анализа:

- Не требуется получение большого количества биологического материала, выделение ДНК из клеток, а также использование радиоизотопа Р -32.
- Возможность анализировать на всех стадиях клеточного цикла, в том числе в интерфазе, что в ряде случаев позволяет обходиться без исследования метафазных пластинок [9].

- Высокая разрешающая способность (на препаратах можно выявлять те хромосомные нарушения, которые не визуализируются в обычный световой микроскоп).

- Точность диагностики (размер проб может варьировать от 90-100 тыс. до нескольких миллионов пар нуклеотидов, так что в качестве мишени могут быть не только отдельные гены или хромосомные участки, но и целая хромосома).

- Данный метод является методом быстрого проведения генетического анализа и дает возможность в короткое время получить результат [10, 11].

В силу своих преимуществ FISH – анализ широко распространен и применяется во всем мире для определения генетических аномалий в программе ПГД. Впервые в Казахстане ПГД методом FISH – анализа внедрен и проводится с 2007 года на базе нашей клиники «Экомед». Так как методика очень сложная, на этапе ее внедрения наши сотрудники ездили в зарубежные страны, в числе которых были Германия, Израиль, Россия, для обучения и обмена опытом. Методика поэтапно собиралась по кусочкам из многочисленных нюансов, которые обязательно нужно было учитывать, чтобы провести успешную диагностику. Были приобретены дорогостоящие флуоресцентный микроскоп Olympus (Япония) с компьютерной программой Applied Imaging (Англия), зонды фирмы Vysis (США) и множество другой аппаратуры и реагентов, обеспечивающих возможность проведения FISH-анализа. На ранних этапах внедрения метода были проведены пробные циклы на выбракованных ЗРН эмбрионах, а также при каждой диагностике были включены контрольные стекла с фиксированными мужскими лейкоцитами, чтобы исключить технические ошибки процедуры. Наиболее частой причиной для проведения ПГД в нашей клинике являлись следующие причины: возраст женщины более 35 лет, более 2-х выкидышей, замерших беременностей, безуспешные попытки ЭКО в анамнезе.

Целью данного исследования явилось изучение методом FISH – анализа генетических показателей получаемых эмбрионов в программах ЭКО, а также эффективности технологии вспомогательной репродукции в зависимости от результатов FISH – анализа эмбрионов и анамнеза женщины.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В наших исследованиях для определения анеуплоидий мы использовали специфические ДНК-зонды Multivision PGT на 13, 18, 21, X, Y хромосомы, так же Multivision PB на 13, 16, 18, 21, 22 хромосомы (фирма «Vysis»). Исследование проводилось в рамках программы ЭКО. 71 супружеская пара была обследована в 74 циклах ЭКО. Средний возраст женщин составил 37,3 лет. 392 эмбрионам произведена биопсия бластомера.

ПГД эмбрионов состояла из 2 стадий – биопсии бластомера и молекулярно-цитогенетического исследования методом FISH-анализа фиксированного ядра бластомера. Биопсию бластомеров делали на 3-й день развития эмбриона на 6-8 клеточной стадии до компактизации его бластомеров. Технику биопсии эмбрионов проводили с помощью микроманипуляторов Narishige (Япония) с применением механического хэтчинга. После получения бластомера проводили фиксацию его ядра на предметном стекле. Далее диагностика переходила в молекулярно-цитогенетическую часть исследования. В течении нескольких часов, на интересующие согласно анамнезу супружеской пары, хромосомы проводили FISH-диагностику, которая состояла из следующих этапов:

- Предварительная обработка образцов
- Денатурация
- Гибридизация
- Промывание после гибридизации
- Контрольное окрашивание
- Интерпретация результатов

По итогам FISH-диагностики эмбрионы, признанные «здоровыми», т.е. без генетических аномалий, допускались на перенос. На пятый день культивирования в полость матки переносили только 2 эмбриона, допущенные на перенос и лидирующие по физиологическому развитию.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение анеуплоидных аберраций аутосомных хромосом 13, 18, 21, а также половых хромосом имеет большое значение в связи с тем, что данные нарушения занимают превалирующее место среди хромосомной патологии. Причем с возрастом пациентов риск рождения у них ребенка с хромосомной аномалией возрастает. В связи с этим по возрастным показателям женщины были разбиты на четыре группы (Рисунок-1):

1. До 30 лет
2. от 30 до 35
3. от 35 до 40
4. Старше 40 лет

Из рисунка видно, что по возрастным показателям у нас преобладали женщины старшего возрастного диапазона. Отягощающим фактором является возраст пациенток старше 35 лет. Доля таких женщин, обратившихся к методу ЭКО+ПГД, составила 54 %, из них почти 55 % – это женщины старше 40 лет.

Беременности, наступившие в результате лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), относятся к группе высокого риска по невынашиванию.

Общая частота репродуктивных потерь из-за самопроизвольных абортов в различных сроках и неразвивающихся беременностей достигает 30–35 %. Поэтому, независимо от возрастных показателей, женщины были разгруппированы еще и по репродуктивному анамнезу (Рисунок-2). Как показано на рисунке-2, у женщин, проходивших программу ПГД, в большинстве случаев наблюдалось вторичное бесплодие. Поэтому, одним из сложных и требующих особого внимания аспектов при лечении женщин с проблемой

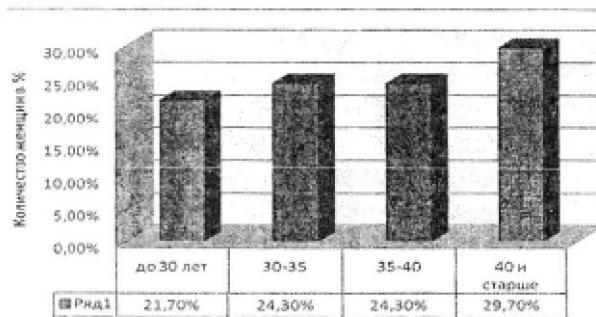


Рис. 1. Возрастные группы женщин



Рис. 2. Репродуктивный анамнез

бесплодия методами ВРТ является максимальное снижение частоты невынашивания беременности и перинатальных потерь, которые несколько превосходят аналогичные показатели при беременности, наступившей в результате естественного оплодотворения. В проведенных исследованиях были выявлены следующие типы анеуплоидных аберраций: по аутосомным хромосомам – моносомии, трисомии (Синдромы Патау, Эдвардса и Дауна), тетрасомии, пентасомии, по половым хромосомам – синдромы Шершевского-Тернера, Кляйнфельтера, а также трисомии и полисомии по Х-хромосоме. Кроме того, в двух случаях были найдены мозаичные (неполные) формы анеуплоидных аберраций.

Более подробная картина частоты выявленных анеуплоидных аберраций в зависимости от возраста женщин показана на рисунке-3. Из диаграммы следует, что с увеличением возраста женщин в виде положительной корреляции нарастает частота нерасхождения хромосом в процессе гаметогенеза, что соответствует мировым данным.

Следует обратить внимание на тот факт, что частота анеуплоидных аберраций в группах женщин с отягощенным репродуктивным анамнезом

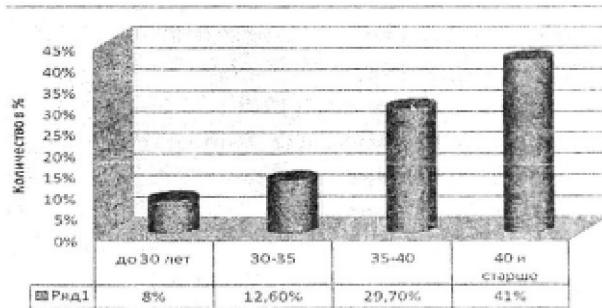


Рис. 3. Частота анеуплоидных аберраций у разных возрастных групп женщин

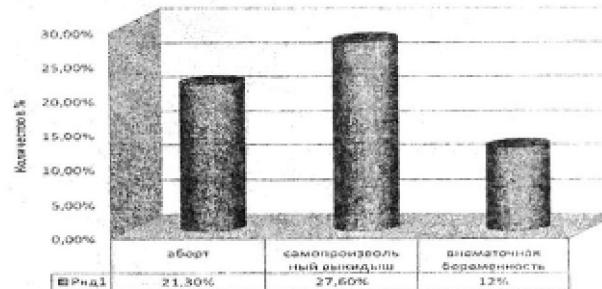


Рис. 4. Частота анеуплоидных аберраций в группах женщин с отягощенным репродуктивным анамнезом

тоже была на достаточно высоком уровне с максимумом 27,6 % в группе женщин, в анамнезе которых были случаи самопроизвольного выкидыша (Рисунок-4).

Мы считаем, что это может быть связано с эндогенными факторами организма, т.е. с кариотипом женщин или их супругов. Это указывает на необходимость проведения цитогенетического исследования лимфоцитов периферической крови обоим супружам программы ЭКО+ПГД.

В ходе исследования были получены следующие итоговые результаты:

- 71 супружеских пар обследовано в 74 циклах ЭКО
- 392 эмбрионам произведена биопсия blastomera
- 43% эмбрионов нормальны по исследуемым хромосомам
- 38% аномальны по исследуемым хромосомам
- 19% безинформативная диагностика
- частота наступления беременностей 20,5 %

## ВЫВОДЫ

- Анализ результатов ПГД с применением ДНК-зондов показал, что данная диагностика может являться хорошим профилактическим мероприятием в рамках программы ВРТ с целью снижения репродуктивных потерь.
- ПГД дает возможность снизить показатели невынашивания беременности у супружеских пар с отягощенным репродуктивным анамнезом и у женщин старшего репродуктивного возраста
- В силу того, что по литературным и нашим данным, ПГД дает возможность выявления хромосомных аномалий в 97-98%, женщинам, у которых наступила беременность в результате ЭКО с применением ПГД, необходимо так же проведение пренатальной диагностики плода.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гоголевская И.К. Преимплантационная генетическая диагностика: современное состояние и последние научные открытия. «Проблемы репродукции», № 1-1999, с.19-26
2. Под ред. Кулакова В. И., Леонова Б.В. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия. М., МИА, 2000, глава 9, с. 230-233
3. Харпер Д. Преимплантационная генетическая диагностика. Элдер К., Дэйл Б. Экстракорпоральное оплодотворение. М., Медпресс, 2008, с. 265-289

4. Edwards R, Gardner R. Sexing of five rabbit blastocysts // Nature. 1967. Vol. 214. P. 567-577.

5. Saiki R. et al. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genetic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // Science. 1985. Vol. 230. P. 1350-1354.

6. Handyside A.H. et al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. Nature 1990; 344: 768-770.

7. Harper J.C. et al. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos. Prenat Diagn 1995; 15: 41-49.

8. Manor D. et al. Preimplantation diagnosis by FISH: the Rambam experience. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 1998; 16: 5: 308-309.

9. Ворсанова С.Г. Хромосомные аномалии у детей с не-дифференцированными формами умственной отсталости по данным молекулярно-цитогенетических исследований // Цитол. и генет. 1993. Т.27. №3. С.72-78.

10. Liu J. et al. Polymerase chain reaction analysis of the cystic fibrosis DF 508 mutation in human blastomeres following oocyte unjection of a single sperm from a carrier // Prenatal diagnosis. 1993. Vol. 13. P. 878-880.

11. Tkachuk D. et al. Clinical applications of fluorescence in situ hybridization // Genet. Anal. Tech. Appl. 1991. P. 8. P. 67-74.

## Резюме

Қазақстанда ең алғашкы рет имплантацияға дейінгі генетикалық диагностика (ИГД) әдісін тәжірибелеге ендірудің барысында алынған зерттеу нәтижелері көлтірілген. Зерттеуге алынған топта денеден тыс ұрықтандыру (ДТҰ) бағдарламасынан етіп жаткан 71 әйел болған. ИГД FISH (Fluorescence in situ hybridization) әдісінің көмегімен жүргізілді. FISH-диагностиканы жүргізу барысында анықталған анеуплоидиялардың жиілігі мен кейбір физиологиялық факторлар арасында тәуелділік бар екендігі белгілі болды. Зерттеудің нәтижелері бойынша анеуплоидтық aberrациялар мен әйел жасы арасында байланыстың болатындығы, сонымен катар олардың жиілігіне ауыр репродуктивтік анамнездің әсер ететіндігі анықталды. Үлкен репродуктивтік жастағы және ауыр репродуктивтік анамнезі бар әйелдерде ДТҰ бағдарламасының аясында репродуктивтік шығындарды азайту мақсатында FISH әдісін қолданудың тиімділігі турали қорытынды жасалынды.

## Summary

In article were presented researches data received as a result of introduction for the first time in Kazakhstan of the method of the preimplantation genetic diagnostics (PGD). In group investigated there were 71 women, passing the program in vitro fertilization (IVF). PGD has been presented by method FISH (Fluorescence in situ hybridization). During carrying out FISH-diagnostic has been established dependence of frequency occurrence aneuploidies from some physiological factors. Following the results of research has been revealed communication between age of the woman and aneuploidy aberrations, and also influence of the burdened reproductive anamnesis on their frequency. The conclusion is drawn on expediency of application of FISH-diagnostics for decrease in reproductive losses in program IVF, at women of the senior reproductive age and women with miscarriage pregnancy.