

ТЕМПІ РОЗВИТКУ ПРЕІМПЛАНТАЦІЙНИХ ЕМБРІОНІВ ІЗ КОМПЛЕКСНИМИ ХРОМОСОМНИМИ АНОМАЛІЯМИ

Успіх процедури запліднення in vitro ґрунтується на точному виборі для перенесення у порожнину матки ембріонів із найвищим імплантаційним потенціалом. Генетичний скринінг основних хромосомних аномалій дає змогу точно оцінити перспективи подальшого розвитку ембріонів і відбракувати анеуплоїдні зразки ще на етапі культивування. Втім, через інвазивність та технічну складність таке дослідження не може широко використовуватися в клінічній практиці, саме тому актуальним є розроблення безпечних та простих критеріїв оцінки якості ембріонів з урахуванням їхнього генотипу.

На основі інтегрованого аналізу морфологічних та генетичних характеристик ембріонів показано, що комплексні анеуплоїдії негативно позначаються на темпах розвитку преімплантаційних ембріонів, починаючи зі стадії морули. Відтак елімінація ембріонів із хромосомними аномаліями на основі оцінки особливостей будови та темпів поділу є ефективною лише за умови культивування останніх до стадії бластоцисти.

Ключові слова: преімплантаційний генетичний скринінг, комплексні хромосомні аномалії, морфологічні критерії якості ембріонів.

Однією із найактуальніших проблем клінічної ембріології є розроблення критеріїв відбору ембріонів із найбільшим імплантаційним потенціалом. Неінвазивні технології оцінки життєздатності ембріонів ґрунтуються на аналізі використання ними живильних речовин (біохімічні параметри), а також їх морфологічних характеристик і темпів розвитку [1]. Втім, застосування таких методик передбачає лише опосередковане дослідження генетичної складової преімплантаційних ембріонів.

Надзвичайно перспективним напрямом сучасних досліджень є генетична діагностика ембріонів, яка б дозволяла відбирати для наступного перенесення до порожнини матки (ембріотрансферу) зразки без генних чи хромосомних мутацій. Кількісні порушення хромосомного набору можуть виникнути під час утворення або дозрівання гамет, у момент запліднення чи у процесі раннього ембріогенезу [2]. Такі грубі хромосомні аномалії, як комплексні хромосомні аберації, у більшості випадків не сумісні з нормальним ембріогенезом і зумовлюють раннє блокування поділу ембріональних клітин або порушення процесів імплантації ембріонів у порожнині матки [3]. Відтак вибіркоче вилучення ембріонів із подібними відхиленнями і наступний ембріотрансфер хромосомно збалансованих зразків сприяли би підвищенню ефективності застосування допоміжних репродуктивних технологій за рахунок збільшення частоти настання вагітності та запобігання її спонтанному перериванню [4]. Однак уведення генетичної діагностики

до рутинної практики центрів репродуктивного здоров'я неможливе через інвазивність та технічну складність процедури. Саме тому вкрай важливим є встановлення ефективності аналізу морфометричних показників преімплантаційних ембріонів для виявлення та наступного відбракування зразків із кількісними абераціями хромосом. Отже, метою роботи було дослідження морфологічних характеристик культивованих in vitro ембріонів із комплексними хромосомними аномаліями за допомогою сучасних критеріїв оцінки якості ембріонів.

Матеріали та методи

Преімплантаційному генетичному скринінгу (ПГС) підлягали 664 ембріони, отримані у 55 циклах запліднення in vitro. Культивування ембріонів проводили у мікрокраплях середовищ MediCult (Данія) протягом п'яти днів. Далі переносили до порожнини матки ембріони, визнані нормальними за результатами проведеного генетичного дослідження. Морфологічні характеристики ембріонів визначали за критеріями Staessen (на стадії дроблення) та Gardner (на етапі бластуляції). При цьому на третій день розвитку ембріонів оцінювали кількість наявних бластомерів, їхню симетричність та наявність серед клітин ембріона без'ядерних фрагментів [5]. При оцінці імплантаційного потенціалу ембріонів на 5-й день культивування звертали увагу на товщину блискучої оболонки, кількість та щільність упакування клітин вну-

трішньоклітинної маси і трофктодерми, сформованість бластоцелю [5].

Біопсію бластомера для проведення преімплантаційного скринінгу проводили на третій день розвитку ембріона, коли всі його клітини є тотипотентними [4]. Варто наголосити, що бластомери для дослідження вилучали в ембріонів, що містили понад 6 клітин, у такому разі втрата частини клітинного матеріалу не позначалася негативно на розвитку ембріона [6]. Крім того, проводили також дослідження хромосомного набору ембріонів, що зупинилися у розвитку до моменту проведення біопсії; при цьому навіть ембріони, визнані еуплоїдними, не переносили до порожнини матки.

Генетичний матеріал вилучених клітин фіксували за допомогою суміші Карнуа. Дослідження кількості статевих хромосом та гомологів 13-, 16-, 18-, 21-, 22-ої пар аутосом у фіксованому матеріалі виконували методом флуоресцентної *in situ* гібридизації з використанням комерційного набору PB Multivision Panel та суміші зондів на статеві хромосом CEPX/CEPY (Vysis Abbot, США). Зразки денатурували 8 хв при 69 °С, після чого інкубували протягом 4 год. у вологій камері за температури 37 °С. Постгібридаційне оброблення складалося з промивання у 0,7xSSC/0,4 % NP-40 при 73 °С (7 хв) та 2xSSC/0,1 % NP-40 за кімнатної температури. Ефективність аналізу становила 88,2 %, відсутність результатів пояснювалася фрагментованістю чи відсутністю ядра у фіксованому бластомері або порушенням процесів гібридизації зондів із генетичним матеріалом, яку неможливо передбачити завчасно.

Процедуру преімплантаційного генетичного скринінгу проводили у пацієнок старшого репродуктивного віку (понад 35 років) та у жінок, в анамнезі яких спостерігалися рекурентні самовільні переривання вагітності (особливо у випадку доведеної хромосомної патології плода) та численні невдалі програми запліднення *in vitro* за умови перенесення до порожнини матки ембріонів високої якості [6, 7]. Варто зазначити, що каріотипування лімфоцитів периферійної крові проводили всім подружжям, включеним до циклів лікування із застосуванням ПГС; обстежені пацієнти мали нормальний каріотип.

Результати дослідження та їх обговорення

Серед 382 ембріонів, що за результатами проведеного генетичного дослідження були визнані аномальними, 182 (47,6 %) мали комплексні хромосомні аберації. При цьому у 19,8 % патологічних зразків спостерігали втрату гомологів різних пар хромосом, а у 20,3 % – визначалась наявність додаткової копії кількох проаналізованих хромосом (табл. 1). Основна частина ембріонів

із комплексними генетичними аномаліями (61,5 %) характеризувалася одночасною втратою та набуттям хромосом різних пар, що, вірогідно, є наслідком порушення процесів реплікації та сегрегації генетичного матеріалу в мітозі.

Таблиця 1. Характеристики комплексної патології обстежених ембріонів

Типи комплексної хромосомної патології ембріонів	Варіанти виявлених аномалій	Частка ембріонів із комплексною хромосомною патологією, %
За кількістю залучених до аномалії хромосом	2 хромосоми	48,4
	3 хромосоми	33,1
	≥ 4 хромосоми	18,5
За типом виявленого відхилення	Втрата гомологів хромосом різних пар	19,8
	Набуття додаткових копій кількох хромосом	20,3
	Одночасне набуття додаткових хромосом і втрата гомологів	61,5

Вибірковий аналіз ембріонів із комплексними хромосомними аномаліями (табл. 1) показав, що відповідно до очікуваних результатів майже половину виявлених відхилень становили кількісні аберації 2 хромосом. Водночас виявлено надзвичайно високий рівень генетичних аномалій із залученням 4 чи 5 хромосом ($n = 24$), що, вірогідно, спричинене вираженими порушеннями контролю мітотичних процесів.

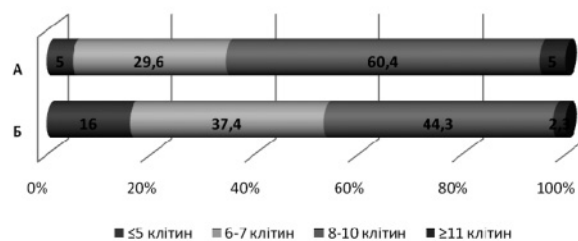


Рис. 1. Порівняльна характеристика кількості бластомерів: А – еуплоїдних ембріонів, Б – ембріонів із комплексними хромосомними аномаліями. Дані отримані через 72 год. після запліднення

Морфологічний аналіз ембріонів із кількісною хромосомною патологією (рис. 1) показав, що, незважаючи на важкі генетичні відхилення, на третій день розвитку 81,7 % з них склалися з 6–10 бластомерів. Високі темпи дроблення, характерні для цієї групи ембріонів, розглядаються як показники їхнього імплантаційного потенціалу [5]. Відтак на етапі дроблення зразки з комплексними хромосомними аномаліями за темпами розвитку не відставали від контрольної групи, 90,0 % якої становили ембріони високої якості ($p > 0,05$). Отримані результати поясню-

ються тим, що генетичний апарат ембріона активується лише на третій день його розвитку, і до цього моменту його потреби забезпечуються резервами ооцита [8]. Отже, навіть складні хромосомні аномалії не мають вираженого впливу на темпи розвитку патологічних ембріонів.

На п'ятий день культивування стадії бластоцисти досягли лише 42,6 % ембріонів із комплексними хромосомними аномаліями (рис. 2), що достовірно нижче показників генетично нормальних ембріонів (69,2 % бластуляції, $p < 0,05$). Зазначимо, що 52 % бластоцист, визнаних нормальними за результатами проведеного генетичного скринінгу, розпочали вилуплення на п'ятий день розвитку. Водночас серед ембріонів із комплексними анеуплоїдіями на відповідному етапі лише у 19,2 % розпочинався процес хетчингу, тоді як у визнаних нормальними ембріонів цей показник становив 36 % ($p < 0,05$).

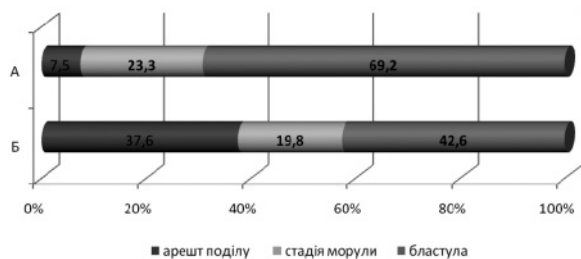


Рис. 2. Порівняльна характеристика морфологічних показників: А – еуплоїдних ембріонів, Б – ембріонів із комплексними хромосомними аномаліями. Дані отримані через 144 год. після запліднення

Процес бластуляції є одним із критичних етапів реалізації природної селекції генетично нормальних ембріонів. На цій стадії розвитку ембріон проходить первинне диференціювання, що визначає, які саме клітини формуватимуть власне плід (внутрішньоклітинна маса) або плідні оболонки (трофектодерма). Крім того, ще на 3-й

день розвитку ембріона запускається активація власне ембріонального геному, а потреби у синтезі починають переважати процеси розщеплення, що вимагає переходу до анаболічного обміну речовин [9]. Саме на цьому етапі починають включатися точки контролю клітинного циклу, що зумовлює мітотичний блок певної частини клітин з аномаліями хромосомного набору [10]. Ймовірно, дія вказаних механізмів пояснює виявлене у проведеному дослідженні п'ятикратне зростання частоти блокування розвитку анеуплоїдних ембріонів при переході до первинного диференціювання порівняно з групою контролю (рис. 2).

Висновки

З огляду на складність, інвазивність та значну витратність процедури преімплантаційного генетичного скринінгу хромосомних аномалій, важливим є розроблення неінвазивних методик, які б уможлилювали відбір генетично здорових ембріонів для ембріотрансферу. Проведені дослідження показали, що такі грубі генетичні порушення, як комплексні анеуплоїдії, негативно впливають на темпи розвитку преімплантаційних ембріонів, починаючи зі стадії морули, відтак їхня елімінація на стадії дроблення на основі оцінки характеристик будови є неефективною. Сучасні морфологічні критерії селекції ембріонів дають змогу виявити більшість ембріонів із хромосомними аномаліями лише за умови пролонгованого культивування останніх. На основі комплексного дослідження морфологічних та генетичних характеристик ембріона створена неінвазивна методика відбору еуплоїдних ембріонів для перенесення у порожнину матки завдяки вилученню зразків із важкими генетичними аномаліями ще на етапі їхнього культивування до стадії бластоцисти.

Література

1. Selection criteria for human embryo transfer : a comparison of pyruvate uptake and morphology / J. Conaghan, K. Hardy, A. H. Handyside et al. // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 1993. – Vol. 10, № 1. – P. 21–30.
2. Kuliev A. Meiotic and mitotic nondisjunction : lessons from preimplantation genetic diagnosis / A. Kuliev, Y. Verlinsky // *Hum. Reprod. Update.* – 2004. – Vol. 10, № 5. – P. 401–407.
3. Role of aneuploidy on embryo implantation // V. I. Farfalli, M. C. Magli, A. P. Ferraretti et al. // *Gynecol. Obstet. Invest.* – 2007. – Vol. 64. – P. 161–165.
4. Preimplantation genetic diagnosis // P. Braude, S. Pickering, F. Flinter et al. // *Nat. Rev. Genet.* – 2002. – Vol. 3, № 12. – P. 941–53.
5. Bączkowski T. Methods of embryo scoring in vitro fertilization / T. Bączkowski, R. Kurzawa, W. Głębowski // *Reprod. Biol.* – 2004. – Vol. 4, № 1. – P. 5–22.
6. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)' // A. R. Thornhill, C. E. deDie-Smulders, J. P. Geraedts et al. // *Hum. Reprod.* – 2005. – Vol. 20, № 1. – P. 35–48.
7. Микитенко Д. О. Нова парадигма доімплантаційної генетичної діагностики / Д. О. Микитенко, В. Д. Зукін, О. В. Підгорна // *Здоров'я жінки.* – 2011. – № 8 (64). – С. 24–32.
8. Braude P. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development // P. Braude, V. Bolton, S. Moore // *Nature.* – 1988. – Vol. 332. – P. 459–461.
9. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? Experience with blastocyst biopsy and testing for aneuploidy // R. P. S. Jansen, M. C. Bowman, K. A. de Boer et al. // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol. 23, № 7. – P. 1476–1478.
10. Wells D. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization // D. Wells, J. D. A. Delhanty // *Mol. Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 6, № 11. – P. 1055–1062.

O. Chaplia, J. Gontar, N. Buderatska, I. Ilin, N. Bilko

DEVELOPMENTAL CHARACTERISTICS OF HUMAN PREIMPLANTATION EMBRYOS WITH COMPLEX CHROMOSOMAL ANOMALIES

Precise selection of the embryos with the higher implantation potential for embryotransfer contributes a lot to the success of in vitro fertilization procedure. Preimplantation genetic screening of major chromosomal abnormalities gives the opportunity to detect aneuploid specimens during the cultivation stage. Nevertheless, the invasiveness and technical complexity of this technology limits its use. Therefore the development of new embryo scoring methods that take into account embryo genotype is extremely perspective.

The integrated analysis of morphologic and genetic embryo characteristics demonstrated that complex aneuploidies exhibit negative effect on embryo development starting from morulae stage. Thus the elimination of chromosomally abnormal embryos on the basis of division speed and morphology evaluation is effective only in case of prolonged embryo cultivation.

Keywords: preimplantation genetic screening, complex chromosomal abnormalities, embryo morphology scoring.

Матеріал надійшов 10.09.2012