
ОПТИМИЗАЦИЯ ВЕДЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

П.А. Базанов, Н.Г. Митюшина, Е.В. Юткин

Центр передовых репродуктивных технологий «Витроклиник»
Волоколамский проезд, 1А, Москва, Россия, 125424

Е.Ю. Воскобоева

Лаборатория наследственных болезней обмена веществ
ФГБУ «МГНЦ» РАМН
ул. Москворечье, 1, Москва, Россия, 115478

В статье представлены данные исследования по оптимизации ведения пациентов, которым показано проведение преимплантационной генетической диагностики (ПГД), выявление возможностей расширения спектра показаний к проведению ПГД, а также показать обоснованность выполнения ПГД у фертильных пациентов.

Ключевые слова: преимплантационная генетическая диагностика, ЭКО.

Широкое распространение вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [8—11], согласно данным Европейского сообщества эмбриологии и репродукции человека (ESHRE), привело к появлению более 5 миллионов детей во всем мире. Соответственно последнему ежегодному отчету ESHRE, в 2009 году, после выполнения почти 1,5 миллионов попыток ЭКО, родилось около 350 000 детей [15]. Настолько массовое внедрение ВРТ подчеркивает актуальность не только проблемы определения качества переносимых в полость матки эмбрионов, но и выявления категорий пациентов, которым необходимо проведение вспомогательных репродуктивных технологий.

Преимплантационная генетическая диагностика (ПГД) — один из перспективных методов, позволяющих дать ответ на этот и ряд других вопросов. Наиболее частым показанием к ПГД еще несколько лет назад был скрининг анеуплоидий. Данная методика, в настоящее время называемая преимплантационный генетический скрининг (ПГС), была разработана для цитогенетического анализа эмбрионов при следующих показаниях: старший репродуктивный возраст, большое число безуспешных попыток ЭКО, отсутствие имплантации при переносе эмбрионов хорошего качества, значительное снижение качества спермы [2]. Однако, по данным проведенных рандомизированных контролируемых исследований, использование классической ПГД анеуплоидий (ПГС) при выполнении биопсии на стадии дробления, не повышает частоту имплантации и, следовательно, вероятность наступления беременности [7]. В настоящее время, в отличие от указанных выше семейных пар, для которых использование ПГД сомнительно, появляется новая категория пациентов, которым проведение преимплантационной генетической диагностики показано — это фертильные пациенты.

Преимплантационное обнаружение мутаций у эмбрионов необходимо пациентам с высоким риском передачи по наследству моногенных заболеваний (аутосомно-рецессивных, аутосомно-доминантных, X-сцепленных), с семейной предрасположенностью к онкологическим заболеваниям, а также приобретенным болезням (резус-сенсбилизация) или дебютирующим в позднем возрасте, хромосомными транслокациями [4, 13]. Так, соответственно 10 последнему ежегодному отчету Европейского сообщества эмбриологии и репродукции человека, из 2042 случаев выполнения ПГД наследственных, приобретенных заболеваний или хромосомных транслокаций, большинство семейных пар (1354 — 66,3%) были фертильны, т.е. именно ПГД было единственным основанием для выполнения ЭКО [6]. Однако, несмотря на достигнутые успехи, указанная методика отличается некоторым числом неоднозначных моментов, ограничивающих применение ПГД, а именно: необходимость интенсивной стимуляции пациентки, вероятность остановки дробления эмбриона после биопсии, феномен мозаицизма, недостаточное количество ДНК, получаемой при биопсии единичного blastomera, выпадение аллеля при проведении молекулярно-генетического этапа, отсутствие эмбрионов, пригодных к переносу в полость матки, снижение вероятности беременности после ПГД вследствие стрессорного воздействия на эмбрион — биопсии.

Цель исследования: оптимизировать ведение пациентов, которым показано проведение ПГД, выявить возможность расширения спектра показаний к проведению ПГД, а также показать обоснованность выполнения ПГД у фертильных пациентов.

Материалы исследования. В клинике проведено 26 программ ЭКО — ПГД, из которых 16 — диагностика моногенных заболеваний и 10 — обнаружение транслокаций. Средний возраст пациенток на момент обращения составил $31,04 \pm \pm 4,3$ года (от 24 до 38 лет). У 10 пациенток (62,5%) из 16 с моногенными заболеваниями — больной ребенок, у 4 из них — в анамнезе гибель ребенка от наследственного заболевания. Кроме того, у 7 из 10 пациенток — от 1 до 3 медицинских аборт при обнаружении плода с патологическим генотипом по данным пренатальной диагностики, выполненных после родов больным ребенком. У 8 из 10 пациенток с транслокациями в анамнезе спонтанные прерывания беременности: у 4 пациенток — по 1, у 2 семейных пар — по 2 прерывания и у 2 женщин — по 3 выкидыша на сроке до 10 недель.

Пациенты обращались со следующими заболеваниями: гемофилия А, хореза Хантингтона, врожденный ихтиоз, нейрональный цероидный липофусциноз тип 2, аденогенитальный синдром, сольтеряющая форма, спинальная амиотрофия Верднига—Гофмана, ахондроплазия, ретинобластома, муковисцидоз. В группе с транслокациями проводилась ПГД обмена участками между следующими хромосомами: 6:11, 6:11, 1:4, 11:22, 13:14, 13:14, 13:14, 4:14, 14:18.

При проведении обследования репродуктивного статуса пациенток и их супругов выраженных нарушений репродуктивного здоровья обнаружено не было.

Методы исследования. Все пациенты с наследственными заболеваниями предварительно были обследованы в медико-генетических консультациях, на ос-

новании полученного медико-генетического заключения с указанием мутаций во всех случаях было проведено предварительное моделирование ПГД.

Подготовительный этап к проведению ПГД моногенных заболеваний включал в себя следующие шаги:

1. Подбор информативных, сцепленных с мутацией полиморфных маркеров. Исследования проводили на геномной ДНК родителей, живого больного ребенка (или на ДНК, выделенной из оставшегося от погибшего ребенка биологического материала — пятна крови, остатки пуповины, волосы и т.д.) и на ДНК родственников (если они носители мутации).

2. Разработка дизайнов праймеров для двухраундной ПЦР системы для работы на единичных клетках.

3. Апробирование разработанной ПЦР системы на единичных ядродержащих клетках из различных тканей.

Описанные исследования проводились на ядродержащих единичных клетках крови обоих родителей, которые содержат диплоидный геном и являются моделями бластомеров, на которых проверяется работа всей системы подобранных праймеров.

После подтверждения правильности подобранных праймеров и подготовки семейных пар проводили программу ЭКО — ИКСИ по стандартной методике:

1) контролируемая стимуляция суперовуляции;
2) трансвагинальная пункция фолликулов под ультразвуковым контролем под внутривенной анестезией;

3) оплодотворение зрелых ооцитов по стандартной методике ИКСИ, с оценкой оплодотворения на следующий день (через 16—18 часов после проведения ИКСИ) и культивированием нормально оплодотворенных ооцитов;

4) биопсия бластомеров выполнялась на 3-й день культивирования при достижении эмбрионами 6—8 клеточной стадии после формирования отверстия в блестящей оболочке эмбриона с помощью 3D механического хэтчинга. Каждый бластомер трехкратно отмывали в специальной среде и помещали в пробирки для ПЦР, содержащие лизирующий буфер. Эмбрионы после биопсии культивировали по одному в каплях 30 мкл среды под слоем масла до 5-го дня. В ряде случаев проводилась биопсия трофэктодермы на 5-е сутки культивирования эмбриона, после чего эмбрионы витрифицировались;

5) непосредственно преимплантационная генетическая диагностика методом ПЦР: стандартная двухраундная ПЦР с последующей рестрикцией или аллель-специфической амплификацией, или количественно-флюоресцентная ПЦР с использованием от 3 до 5 высокоинформативных полиморфных маркеров с обеих сторон, фланкирующих либо мутацию, либо исследуемый локус;

6) перенос в полость матки протестированных эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, не гомозиготных по мутациям («здоровых» или носителей) или без тестируемых транслокаций. Перенос эмбрионов в полость матки выполняли под ультразвуковым контролем в асептических условиях;

7) определение уровня β -субъединицы хорионического гормона человека в сыворотке крови через 14 суток после переноса эмбрионов с последующим ультразвуковым исследованием через 10 дней в случае получения положительного результата.

Результаты исследования. В ходе проведенной работы всего было выполнено 26 программ ЭКО-ПГД. У 4 пациенток (15,4%) отмечено развитие синдрома гиперстимуляции яичников I степени.

Всего в результате проведенных трансвагинальных пункций фолликулов было получено 295 ооцитов, в среднем $10,4 \pm 2,9$ ооцита на пациентку (от 4 до 26 ооцитов), из которых зрелыми были 246 (85,8%), что в среднем составило $9,7 \pm 2,6$ на пациентку. Дегенеративных клеток было 23, что в среднем оказалось 1,8 на пациентку. После выполнения ИКСИ коэффициент нормального оплодотворения составил 89,4%, т.е. всего оплодотворился 221 ооцит (по 8,8 на пациентку).

При оценке качества эмбрионов на 3 сутки развития пригодными к биопсии было признано 194 эмбриона, т.е. было биоптировано в среднем $7,8 \pm 2,3$ эмбриона на человека, что составило 88,2% от нормально оплодотворенных зигот.

Молекулярно-генетический этап был проведен успешно во всех случаях. В 8 случаях произошло выпадение аллеля в 1—3 биоптатах (в среднем 1,2), в 6 случаях не было получено сигнала от 1 до 5 биоптатов (в среднем 1,3). Несмотря на это, у всех пациентов были получены молекулярно-генетические заключения, всего по 143 эмбрионам (в среднем по 5,6 эмбриона на пациента), что составило 73,7% от всего числа биоптированных эмбрионов. Ни одного случая, в котором все эмбрионы были бы больными или все здоровыми, отмечено не было.

Всего больными, т.е. гомозиготными при аутосомно-рецессивном типе наследования или при обнаружении мутации при доминантном типе наследования, или обнаружении транслокаций, были признаны 78 эмбрионов (54,5%). Кроме этого, у 31 эмбриона (21,7% от числа протестированных эмбрионов) были выявлены анеуплоидии (обнаружены анеуплоидии по 13, 16, 18, 21 и половым хромосомам), что также делало эти эмбрионы непригодными к переносу. Таким образом, всего генетически неполноценными были расценены 96 эмбрионов, т.е. 67,1% от 143 протестированных эмбрионов. На основании вышеуказанного с позиции генетического здоровья разрешено было переносить в полость матки 47 эмбрионов (32,9% от общего числа диагностированных эмбрионов).

Необходимо отметить, что переносы эмбрионов осуществлялись не во всех случаях, а в 18 из 26 (69,2%) проведенных программ ЭКО-ПГД, так как требуемое для переноса эмбрионов сочетание морфологического качества и отсутствия мутаций у протестированных эмбрионов было только у этого числа пациентов. Всего было перенесено 24 эмбриона (от 1 до 3), в среднем по $1,3 \pm 0,24$ эмбриона на перенос на пациента. Беременность наступила в 7 из 18 случаев, что составило 38,9% на перенос эмбрионов и 26,9% на начатый цикл ЭКО-ПГД. Ни в одном случае не было многоплодной беременности, на момент написания статьи ни одного случая спонтанного прерывания беременности не зафиксировано.

Обсуждение полученных результатов. Несмотря на данные о некотором снижении частоты наступления беременности после ПГС [1, 7], выполнение ПГД при транслокациях позволяет значительно повысить вероятность вынашивания беременности [12]. Так, частота благополучного исхода беременности выросла от 11,5% при спонтанной беременности при носительстве транслокации одним из партнеров, до 87% после выполнения ПГД (при исключении или коррекции других возможных факторов невынашивания беременности). В нашей работе, ввиду небольшого числа наблюдений, сложно достоверно заявлять о частоте вынашивания беременности, однако необходимо отметить, что ни в одном случае не было отмечено спонтанного прерывания беременности на ранних сроках.

Одной из основных проблем, осложняющих выполнение протоколов ПГД, — резкое уменьшение числа эмбрионов в ходе выполнения данной программы в результате постепенного отсеивания при биопсии, получении результатов молекулярно-генетического и эмбриологического этапов. Так, в нашей работе перенос эмбрионов был выполнен только в 69,2% случаев. Однако необходимо отметить, что среднее число полученных на пункции ооцитов (10,4) было достоверно меньше аналогичного показателя по данным ESHRE — 13,4 [6]. Тем не менее частота наступления беременности после переноса эмбрионов статистически не различалась с вероятностью беременности по этим же данным [6]. Таким образом, классические рекомендации проведения интенсивной стимуляции в программах ПГД не являются актуальными при выполнении ПГД у фертильных пациентов. Отдельно необходимо отметить отсутствие многоплодных беременностей, что также может быть вызвано небольшим числом переносимых эмбрионов ($1,3 \pm 0,24$), причем относительно высокая вероятность беременности (38,9% на перенос эмбрионов и 26,9% на начатый цикл ЭКО-ПГД) свидетельствует о достаточности числа переносимых эмбрионов. Указанные данные демонстрируют возможность более щадящего ведения пациентки с сохранением достаточно высокой эффективности лечения.

Важно отметить, что вследствие развития методики ПГД постоянно расширяется перечень патологий — показаний к проведению данной диагностики. Более того, в настоящее время конкретный вид заболевания (при генетической информативности семейной пары) уже не является принципиально важным для определения возможности проведения ПГД [5, 14]. Следует заметить, что отмечается постепенная смена спектра заболеваний — показаний для проведения ПГД — если некоторое время назад самым частым показанием к ПГД был муковисцидоз, то согласно последнему, 10-му, регистру данных о проведении ПГД под эгидой Европейского сообщества репродукции и эмбриологии человека (ESHRE), самым частым заболеванием оказалась β -талассемия, а муковисцидоз занял лишь 3-е место по частоте выполнения ПГД [6]. Однако в нашем исследовании чаще встречались неврологические заболевания (миоатрофии), что, возможно, обусловлено относительно небольшим числом наблюдений.

Во всех случаях было выполнено ИКСИ, коэффициент правильного оплодотворения составил 89,4%. Это, на данном этапе накопления материала, несколько

выше указанного в работе J.C. Harper (86,4%), впрочем, эта разница статистически недостоверна [6].

В нашей работе биопсия эмбрионов в основном выполнялась на 3-и сутки дробления эмбриона, данная манипуляция была проведена в 88,2% от числа полученных зигот. Кроме этого, в ряде случаев проводили биопсию трофэктодермы эмбрионов, достигших стадии бластоцисты. Основным преимуществом биопсии эмбриона, выполненной на 3-и сутки культивирования, хоть и ограничивающей возможности работы молекулярных генетиков малым количеством ДНК, полученной из одного бластомера, является возможность выполнения лабораторного этапа ПГД в течение почти 2 суток. Биопсия трофэктодермы позволяет использовать для диагностики несколько клеток, что резко повышает вероятность получения молекулярно-генетического заключения по тестируемому эмбриону, однако ставит перед генетиком крайне жесткие временные рамки, что обычно требует криоконсервации эмбриона и переноса его в следующем менструальном цикле в криопротоколе.

Если по данным последнего обзора данных ПГД-консорциума, средняя вероятность беременности составила 29% [6], а по нашим данным 26,9% на начатый цикл ЭКО-ПГД, то, соответственно данным Schoolcraft [12], в работе которого витрифицировались все эмбрионы после биопсии и после молекулярно-генетического анализа переносились в следующем цикле, вероятность беременности возростала почти в два раза. Более того, при проведении биопсии трофэктодермы практически гарантировано обнаружение ДНК в биоптате, необходимой для выполнения молекулярно-генетического этапа. Указанные данные позволяют рассматривать выполнение биопсии эмбриона на стадии бластоцисты с витрификацией тестируемых эмбрионов с последующим переносом эмбрионов в криопротоколе как эффективную и безопасную разновидность выполнения ПГД.

Необходимо помнить и о возможности сочетания в эмбрионах хромосомной и моногенной патологии. В нашей работе во всех случаях ПГД дополнялась проведением ПГС, при этом у 21,7% эмбрионов фертильных пациентов обнаружены анеуплоидии, что явилось основанием для утилизации этих эмбрионов. Указанный высокий коэффициент подобных эмбрионов свидетельствует о необходимости выявления как моногенной, так и хромосомной патологии. Целесообразность подобного подхода рассматривается и в редакторской статье журнала *Reproductive Bio-medicine Online* 2012 г. [6]. В данном обзоре обсуждается возможность совмещения ПГД моногенных заболеваний и компаративной геномной гибридизации на материале, полученном при биопсии трофэктодермы.

Таким образом, предлагаемые пути оптимизации ведения фертильных пациентов могут быть сформулированы следующим образом:

- 1) проведение более щадящей стимуляции суперовуляции, достаточной для получения небольшого числа эмбрионов;
- 2) выполнение биопсии, по мере возможности, на 5-е сутки развития эмбриона с получением нескольких клеток трофэктодермы;

- 3) витрификация всех биоптированных эмбрионов;
- 4) выполнение преимплантационной генетической диагностики моногенных заболеваний или транслокаций в сочетании с диагностикой анеуплоидий;
- 5) проведение криопротокола с переносом в полость матки не более 2 протестированных эмбрионов.

Таким образом, предлагаемый алгоритм проведения ПГД наследственных заболеваний или транслокаций у фертильных пациентов позволит сделать программу ЭКО-ПГД более физиологичной, вызывающей меньшую нагрузку на пациентку за счет снижения медикаментозной агрессии, в то же время повысить вероятность наступления беременности благодаря более щадящему воздействию на эмбрион, а также более эффективному проведению молекулярно-генетического этапа.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Aleksandrova N.V., Dubova E.A., Doronina O.A., Shchegolev A.I.* Analysis of chromosomal abnormalities and structural changes of placenta with placenta after the use of assisted reproductive technologies // *Bulletin of Peoples' Friendship University of Russia. Series "Medicine. Obstetrics and Gynecology"*. — 2012. — № 5. — P. 96—103.
- [2] *Brown R., Harper J.* The clinical benefit and safety of current and future assisted reproductive technology // *Reproductive Biomedicine Online*. — 2012. — 25. — P. 108—117.
- [3] Editorial. Blastocyst biopsy and preimplantation genetic diagnosis for single gene diseases: a turnaround on the horizon? // *Reproductive Biomedicine Online*. — 2012. — 25. — P. 441—442.
- [4] ESHRE PGD Consortium Best Practice guideline for amplification-based preimplantation genetic diagnosis (PGD), Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F p. 1, 2010.
- [5] *Handyside F.Y., Harton G.L., Mariani B et al.* Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes // *J. Med. Genet.* — 2009. — Oct 25.
- [6] *Harper JC, Coonen E., De Rycke M., Harton G.* ESHRE PGD Consortium data collection X // *Human Reproduction*. — 2010. — Vol. 25. — No. 11. — P. 2685—2707.
- [7] *Mastenbroek S., Twisk M., van der Veen F., Repping S.* Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs // *Human Reproduction Update*. — 2011. 17, 454.
- [8] *Radzinski V.E., Orazmuradov A.A.* // *Early pregnancy. Status praesens*. — M., 2009. P. 480.
- [9] *Radzinskiy V.E., Ordianc I.M., Orazmuradov A.A.* *Women's consultation* — 3-ed. — M.: GEOTAR-media, 2009.
- [10] *Reproductive health: Stud. posob.* Ed. V.E. Radzinsky. — M.: RUDN, 2011.
- [11] *Schoolcraft W.B., Fragouli E., Stevens J.* Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage // *Fertil. Steril.* — 2010. — 94. — P. 1700—1706.
- [12] The Practice Committee of the SART and ASRM. Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion // *Fertility and Sterility*. — 2008. — Vol. 90. — Suppl 3, November.
- [13] *Van de Velde H, De Rycke M, De Man C.* The experience of two European preimplantation genetic diagnosis centres on human leukocyte antigen typing // *Hum. Reprod.* — 2009. — 24. — P. 732—40.
- [14] *Quibbai W., Al-Swaid A., Al-Hassan S.* First successful application of preimplantation genetic diagnosis and haplotyping for congenital hyperinsulinism // *Reproductive Biomedicine online*. — 2011. — 22. — P. 72—79.
- [15] www.eshre.eu/EHRE/English/Guidelines-Legal/ART-fact-sheet/page.aspx/1061 2012

OPTIMIZATION OF PATIENT MANAGEMENT DURING PREIMPLANTACIONNOJ GENETIC DIAGNOSIS

**P.A. Bazanov, N.G. Mityushina,
E.V. Yutkin**

Centre for advanced reproductive technology «Vitrokllinik»
Volokolamsky proezd, 1A, Russia, Moscow, 125424

E.Yu. Voskoboeva

FGBU “Medical genetics research center”
Russian Academy of medical sciences, laboratory
of hereditary metabolic diseases
Moskvorechye str., 1, Moscow, Russia, 115478

The article presents a study on optimization of patients who showed an preimplantacionnoj genetic diagnosis (PGD), identifying opportunities for expanding the range of indications for PGD, and show the validity of the PGD have fertile patients.

Key words: preimplantacionnoj genetic diagnosis, IVF.