

МЕДИЧНІ НАУКИ

УДК 618.177-089.888.11-078:57.088.7

ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОВЕДЕННЯ ПРОТОКОЛУ ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ЗАПЛІДНЕННЯ ПРИ ВИКОРИСТАННІ ПРЕІМПЛАНТАЦІЙНОЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ

Луцький А.С.

Харківський національний медичний університет

У статті представлені дані дослідження по оптимізації ведення пацієнтів, яким проводилася преімплантаційна генетична діагностика (ПГД) у протоколі екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) при різних схемах підготовки ендометрія та підтримки лютеїнової фази. На підставі проведених досліджень показано, що оптимізація протоколу ЕКЗ полягає в проведенні підготовки ендометрія у природному циклі; виконання біопсії для проведення ПГД, в міру можливості, на 5-у добу розвитку ембріона з отриманням декількох клітин трофектодерми; вітрифікація всіх біоптованих ембріонів; виконання ПГД з діагностикою можливих моногенних захворювань, або транслокацій в поєднанні з анеуплоїдією; проведення криопротокола з перенесенням в порожнину матки не більше 2 протестованих ембріонів.

Ключові слова: преімплантаційна генетична діагностика, екстракорпоральне запліднення, підготовка ендометрія.

ПГД – єдиний можливий спосіб виявлення хромосомних порушень у ембріонів. Цей метод дозволяє не тільки запобігти народженню дитини з хромосомними захворюваннями, а й підвищує ефективність ЕКЗ [1]. Дана методика, що в теперішній час має назву предімплантаційний генетичний скринінг (ПГС), була розроблена для цитогенетичного аналізу ембріонів при наступних показаннях: старший репродуктивний вік, велике число безуспішних спроб ЕКЗ, відсутність імплантації при перенесенні ембріонів хорошої якості, при значному зниженні якості сперми. Однак, за даними проведених рандомізованих контрольованих досліджень, використання класичної ПГД за допомогою виконання біопсії на стадії дроблення, не підвищує частоту імплантації та ймовірність настання вагітності [2].

ПГД – це єдина можливість оцінити генетичне здоров'я ембріона до імплантації [3]. Велика кількість досліджень у світовій практиці підтверджує,

що перенесення ембріонів без хромосомної патології підвищує ефективність ЕКЗ і значно збільшує шанси на народження здорової дитини [4].

Однак, незважаючи на досягнуті успіхи, зазначена методика відрізняється деяким чином, що обмежує застосування ПГД, а саме: необхідність інтенсивної гормональної стимуляції пацієнтки, ймовірність зупинки дроблення ембріона після біопсії, феномен мозаїцизму, недостатня кількість ДНК, що отримується при біопсії бластомера, випадіння алелі при проведенні молекулярно-генетичного етапу, відсутність ембріонів, придатних до переносу в порожнину матки, зниження ймовірності вагітності після ПГД внаслідок впливу біопсії на ембріон.

Проведення ПГД можливо тільки в циклах ЕКЗ, оскільки ембріони знаходяться поза організмом матері і доступні для дослідження.

Мета дослідження. Підвищення результативності лікування безпліддя методом ЕКЗ із за-

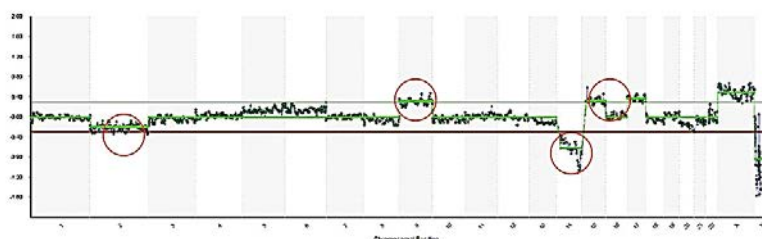
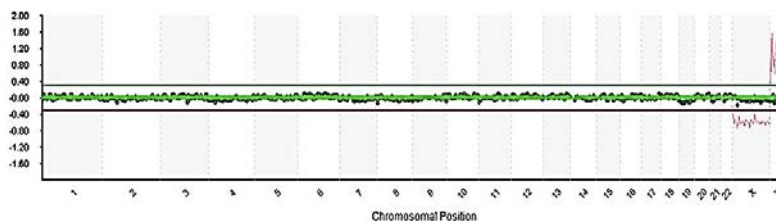


Рис. 1. Результат проведення генетичного аналізу ПГД методом NGS

стосуванням методики ПГД при різних схемах підготовки ендометрія та підтримки лютеїнової фази (ЛФ).

Матеріал і методи дослідження. Дослідження проведено на кафедрі акушерства та гінекології № 2 ХНМУ в клініці репродуктивної медицини імені академіка В.І. Грищенко (м. Харків), де впроваджена технологія ПГД, з метою проведення генетичного аналізу ембріона до його перенесення в матку. У цій клініці використовується інноваційний вид генетичного аналізу – секвенування наступного покоління (NGS). NGS дозволяє «прочитувати» одноразово кілька ділянок геному, що є головною відмінністю від попередніх методів секвенування (рис. 1). На сьогоднішній день це найшвидший і чутливий метод аналізу, який охоплює весь геном цілком [6].

Показаннями для проведення ПГД були:

- вік жінки 35 років і старший;
- мимовільні аборти до 12 тижнів в анамнезі;
- невдалі цикли ЕКЗ в анамнезі;
- наявність в каріотипі подружньої пари хромосомних порушень, генних дефектів;
- високий рівень анеуплоїдії сперми (більше 5%);
- підтверджений випадок анеуплоїдії плода.

Виконання криопротоколу проводилося з перенесенням в порожнину матки не більше 2 протестованих ембріонів.

Проведено обстеження 186 пацієнток, які були розділені на 2 групи. В 1 групу увійшли 94 жінок, яким в протоколі ЕКЗ була проведена ПГД. Другу групу склали 92 пацієнтки, яким в протоколі ЕКЗ ПГД не проводилося.

Метод ПГД шляхом проведення біопсії ембріона представлений на рис. 2.

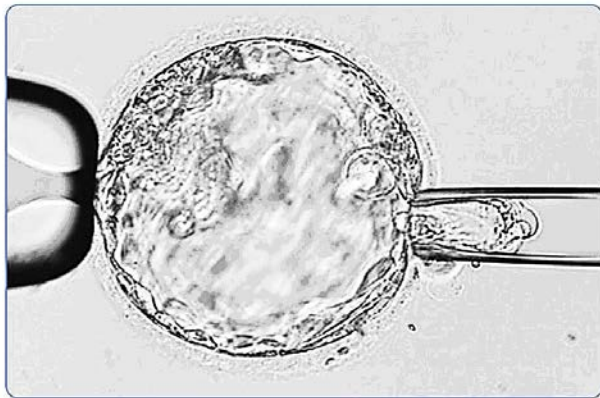


Рис. 2. Виконання ПГД (біопсія ембріону)

Дана маніпуляція виконується за допомогою спеціального інструментарію, який дозволяє взяти лише кілька клітин від майбутніх оболонок ембріона. Клітини самого ембріона залишаються недоторканими, тому це цілком безпечно для майбутньої дитини, що підтверджено багатьма дослідженнями [7].

Отримані клітини досліджувались за допомогою спеціального обладнання (апарат Ion S5, виготовлений Ion Torrent by Thermo Fisher Scientific – США). Аналіз виявляє різні генні і хромосомні порушення. ПГД є також єдиним методом, який дозволяє визначити стать майбутньої дитини до імплантації ембріона [8].

Таким чином, ПГД дозволяє запобігти народженню дитини з хромосомними і генними за-

хворюваннями і значно підвищити ефективність циклів допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) за рахунок зниження рівня ранніх репродуктивних втрат [9].

Всі пацієнтки мали регулярний менструальний цикл, нормальний яєчниковий резерв. У них раніше не було оперативних втручань на органах малого тазу. За даними ультразвукового дослідження (УЗД) у всіх жінок, що були обстежені, у матковій порожнині були відсутні гіперпластичні процеси.

Аналіз генеративної функції показав, що майже у половини обстежених жінок (45%) спостерігалися різні порушення в репродуктивній системі. З огляду на те, що основною причиною звернення пацієнток було безпліддя, виявлено, що первинне і вторинне безпліддя у всіх групах пацієнток зустрічалося з практично однаковою частотою. Не виявлено достовірних відмінностей у частоті визначення інших факторів безпліддя.

Жінки обстежених груп не відрізнялися за кількістю попередніх спроб ЕКЗ, по кількості днів стимуляції і сумарною дозою гонадотропінів (ГТ), а також по днях культивування і кількості перенесених ембріонів.

Крім загальноклінічних методів дослідження, всім пацієнткам проводилося ультразвуковий моніторинг, що дозволило виявити причини розвитку НЛФ. УЗД здійснювалось за допомогою трансвагінального датчика на апараті В-К Medical (Данія).

Після трансвагінальної пункції (ТВП) фолікулів проводили запліднення зрілих ооцитів за методикою інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда (ІКСІ), з оцінкою запліднення через 16-18 годин і культивуванням нормально запліднених ооцитів.

У першій групі спостереження біопсія виконувалася на 5-й день культивування при досягненні ембріонами стадії бластоцисти після формування отвору у блискучій оболонці ембріона за допомогою 3D механічного хетчинга. Ембріони на 5-ту добу культивування вітрифікували [5, 6, 10]. ПГД здійснювалася методом NGS. Перенесення ембріонів в порожнину матки виконували під ультразвуковим контролем в асептичних умовах. Визначення рівня β-субодиниць хоріонічного гормону людини в сироватці крові проводили через 14 днів після перенесення ембріонів з наступним УЗД через 10 днів, в разі отримання позитивного результату.

Кожна група за методом підготовки ендометрія до імплантації була розділена на дві підгрупи: підгрупа А – природний цикл і підгрупа Б – замісна гормональна терапія (ЗГТ). У 1А підгрупу увійшло 50 пацієнток, в 1Б – 44. У 2А підгрупу увійшло 45 жінок, в 2Б – 47. При природному циклі контролювали ріст і дозрівання фолікулів. Через 5 днів після овуляції проводився ембріопереніс. Пацієнткам підгрупи А з дня овуляції підтримка ЛФ здійснювалася шляхом введення 90 мг прогестерону внутрішньопіхвовим засобом. У підгрупах Б для підтримки ЛФ з 3 дня менструального циклу призначали естрадіолу валерату по 6 мг щодня. При досягненні ендометрія 8 мм призначали 25 мг прогестерону для підшкірного введення і 90 мг прогестерону внутрішньопіхвово. Про клінічну ефективність ЕКЗ після підтримки ЛФ та ПГД судили по частоті настання вагітності, діа-

гностику якої проводили при УЗД на 21-22-й день після перенесення ембріонів.

Для статистичної обробки матеріалів дослідження використовували пакет прикладних програм Statistica 7.0 фірми «StatSoft Inc.» (США) для персонального комп'ютера за програмою в операційному середовищі Statistica for Windows і по прикладних програмах пакета Excel.

Результати та їх обговорення. В ході проведеної роботи було виконано кількість перенесених ембріонів на перенесення в кріоциклах з ПГД – 1,1, без ПГД – 1,6.

Молекулярно-генетичний етап ПГД був проведений успішно у всіх випадках спостереження. Однією з основних проблем, що ускладнюють виконання протоколів ПГД, є різке зменшення числа ембріонів в ході виконання даної програми в результаті поступового відсіювання при біопсії, отримання результатів молекулярно-генетичного і ембріологічного етапів [10].

Показники результативності лікування безпліддя методом ЕКЗ із застосуванням методики ПГД при різних схемах підготовки ендометрія представлені в таблиці 1.

У циклах з перенесенням вітрифікованих бластоцист після ПГД, частота імплантації і настання клінічних вагітностей була значно вище, в порівнянні з групою жінок, де ПГД не проводилася. Це пов'язано із селекцією бластоцистної культури після ПГД, так як переносять тільки генетично здорові ембріони.

З іншого боку, при підготовці ендометрія в природному циклі при перенесенні ембріонів в кріоциклах виключається проблема підвищеного прогестерона на день введення тригера фінального дозрівання ооцитів, що сприяє уникненню негативного впливу контрольованої стимуляції яєчників на ендометрій.

Таблиця 1

Показники результативності лікування безпліддя методом ЕКЗ із застосуванням методики ПГД при різних схемах підготовки ендометрія

Параметри	1 група, n=94		2 група, n=92	
	Підгрупи		Підгрупи	
	А, n=50	Б, n=44	А, n=45	Б, n=47
Частота імплантації	76,3%	70,2%	43,1%	36,7%
Частота клінічних вагітностей	35 (70%)	28 (63,6%)	26 (57,7%)	23 (48,9%)
Кількість пологів	32 (64%)	23 (52,2%)	20 (44,4%)	18 (38,2%)
Багатопліддя	5 (10%)	4 (9,09%)	13 (28,8%)	10 (21,2%)
Частота переривання вагітностей	3 (6%)	5 (11,36%)	6 (13,3%)	5 (10,6%)

За даними нашого дослідження виявилось, що виконання ПГД дозволяє значно підвищити ймовірність виношування і настання вагітності (табл. 1). Так, частота клінічних вагітностей в 1 групі спостережень була значно вищою, ніж у другій, при-

чому при підготовці ендометрія в природному циклі ці дані становили 70%, в порівнянні з ЗГТ – 63,6%. У другій групі пацієнток, яким не проводилося ПГД, показники настання вагітності були значно нижчими, ніж в першій групі, як у підгрупі А (57,7%), так і підгрупі Б (48,9%).

Така ж тенденція спостерігалася при аналізі кількості пологів, відсоток яких був значно вище в 1-й групі, в порівнянні з другою.

У жінок 1-ї групи спостерігалася значно менша частота переривання вагітності на ранніх термінах. Найбільш ефективні результати лікування безпліддя були в 1А підгрупі, в якій пацієнткам проводили ПГД і підготовку ендометрія в природному циклі: в підгрупі А (57,7%), після застосування ЗГТ (48,9%) (табл. 1).

Необхідно відзначити значно менший відсоток багатоплідних вагітностей, що також може бути викликано невеликою кількістю перенесених ембріонів. Зазначені дані демонструють можливість більш щадного ведення пацієнтки зі збереженням досить високої ефективності ЕКЗ.

Основною перевагою біопсії ембріона, що була виконана на 3-ю добу культивування, є можливість виконання лабораторного етапу ПГД протягом майже 2 доби. Біопсія трофектодерми дозволяє використовувати для діагностики кілька клітин, що різко підвищує ймовірність отримання молекулярно-генетичного висновку щодо тестованого ембріону, однак ставить перед лікарем-генетиком вкрай жорсткі тимчасові рамки, що зазвичай вимагає кріоконсервації ембріона і перенесення його в наступному менструальному циклі в кріопротоколі.

Дані проведеного дослідження збігаються з результатами інших вчених. Так, Schoolcraft [11], проводив вітрифікацію всіх ембріонів після біопсії і молекулярно-генетичного аналізу. За його даними, при перенесенні ембріонів у наступному циклі ймовірність настання вагітності зростала майже в два рази. Більш того, при проведенні біопсії трофектодерми практично гарантовано виявлення ДНК в біоптаті, необхідної для виконання молекулярно-генетичного етапу.

Зазначені дані дозволяють розглядати виконання біопсії ембріона на стадії бластоцисти з вітрифікацією тестованих ембріонів з подальшим перенесенням їх у кріопротоколи як ефективний і безпечний різновид виконання ПГД.

Висновки. Оптимізація протоколу ЕКЗ полягає в проведенні підготовки ендометрія в природному циклі; виконання біопсії для проведення ПГД, в міру можливості, на 5-ту добу розвитку ембріона з отриманням декількох клітин трофектодерми; вітрифікація всіх біоптованих ембріонів.

Запропонований алгоритм проведення ПГД спадкових захворювань або транслокацій у фертильних пацієнток дозволить зробити програму ЕКЗ-ПГД більш фізіологічною, викликає менше медикаментозного навантаження на пацієнтку, в той же час підвищує ймовірність настання і нормального перебігу вагітності, завдяки більш щадному впливу на ембріон, а також ефективному проведенню молекулярно-генетичного етапу.

Перспективи подальших досліджень полягають в удосконаленні схем підтримки ЛФ циклу для підвищення ефективності ЕКЗ на тлі проведення ПГД.

Список літератури:

1. Калугина А. С., Кравчук Я. Н., Шлыкова С. А. и др. Влияние качества полученных эмбрионов на исходы программ криоконсервации при сравнении методов медленного замораживания и витрификации в циклах ВРТ. Журнал акушерства и женских болезней. 2012; LXI (4): 48-53.
2. Смирнова А. А., Тур-Каспа И. Криоконсервация ооцитов человека: клинические исходы. Проблемы репродукции 2005; № 1: 14-8.
3. Brown R., Harper J. The clinical benefit and safety of current and future assisted reproductive technology // Reproductive Biomedicine Online. 2012. P. 108-117.
4. 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.
5. Thomas J. Kim, Seung Wook Hong. Successful live birth from vitrified oocytes after 5 years of cryopreservation. Assist. Reprod. Genet. 2011; 28: 73-76.
6. Kuwayama M. et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. Hum. Reprod. 2011; 4(1): 23-8.
7. Митюрин Е. В., Перминова С. Г., Амян Т. С. Причины повторных неудач имплантации в программе экстракорпорального оплодотворения Акушерство и гинекология, 2016. – № 11. – С. 34-40.
8. 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.
9. 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. P. 732-40.
10. Cobo A., Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. Fertil Steril. 2011; 96: 277-85.
11. Schoolcraft W. B., Fragouli E., Stevens J. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage // Fertil. Steril. 2010. P. 1700-1706.

Луцкий А.С.

Харьковский национальный медицинский университет

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОТОКОЛА ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Аннотация

В статье представлены данные исследования по оптимизации ведения пациентов, которым проводилась ПГД в цикле ЭКО при различных схемах подготовки эндометрия и поддержке лютеиновой фазы. На основании исследований показано, что оптимизация протокола ЭКО заключается в проведении подготовки эндометрия в естественном цикле; выполнение биопсии для проведения ПГД, по мере возможности, на 5-е сутки развития эмбриона с получением нескольких клеток трофэктодермы; витрификация всех биоптированных эмбрионов; выполнение ПГД с диагностикой возможных моногенных заболеваний или транслокаций в сочетании с анеуплоидией; проведение криопротокола с переносом в полость матки не более 2 протестированных эмбрионов.

Ключевые слова: преимплантационная генетическая диагностика, экстракорпоральное оплодотворение, подготовка эндометрия.

Lutsky A.S.

Kharkov National Medical University

OPTIMIZATION OF CARRYING OUT IN VITRO FERTILIZATION PROTOCOL WHEN USING PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSTICS

Summary

The article presents data of the study on optimization of management of patients, who underwent preimplantation genetic diagnosis (PGD) before the in vitro fertilization (IVF) protocol under various schemes of endometrial preparation and luteal phase support. Based on the studies conducted, it was shown that the optimization of the IVF protocol consists in the preparation of the endometrium in the natural cycle; performing a biopsy for PGD, as far as possible, on the 5th day of the development of the embryo to produce several trophoctoderm cells; vitrification of all biotized embryos; performing PGD with diagnosis of possible monogenic diseases or translocations in combination with aneuploidy; carrying a cryoprotocol with transfer to the uterine cavity no more than 2 embryos tested.

Keywords: preimplantation genetic diagnosis, in vitro fertilization, endometrial preparation.