

## **ВИЯВЛЕННЯ ХРОСОМНИХ АНЕУПЛОЇДІЙ У БЛАСТОМЕРАХ ЛЮДИНИ ЗА ДОПОМОГОЮ FISH ЗБІЛЬШУЄ УСПІХ ЕКЗ, ПОКРАЩУЮЧИ ШАНСИ НА ПРОГРЕСУВАННЯ ЕМБРІОНІВ ДО ПОЛОГІВ**

А. СЕМИХОДСЬКИЙ<sup>1</sup>, М. ІСМАЇЛОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Medical Genomics Ltd, London, United Kingdom, 134 Somerset Road, London, SW19 5HP, United Kingdom

<sup>2</sup> Центральна клінічна лікарня, Проспект Парламенту 76, Баку, Азербайджан AZ1006

E-mail: andrei@medicalgenomics.co.uk, mahiremk@hotmail.com

*Ефективність PGT-A вивчали у пацієнтів із попередньою невдачею ЕКЗ, повторною втратою вагітності, ідіопатичним безпліддям та безпліддям через інші причини. Більше 50 % всіх ембріонів, отриманих у чотирьох експериментальних і одній контрольній групах, були анеуплоїдними. Найчастіше спостерігалися анеуплоїдії аутосом 15 і 18 і обох статевих хромосом. Більшість анеуплоїдій було виявлено у пацієнтів з попередньою невдачею ЕКЗ та ідіопатичним безпліддям. Після відбору еуплоїдних ембріонів для перенесення були досягнуті високі клінічні показники вагітності у всіх досліджуваних групах. Принаймні у 30 % пацієнтів у кожній досліджуваній групі лікування ЕКЗ у поєднанні з PGT-A призводило до народження живої дитини. Найвищий рівень живонародженості спостерігався у пацієнтів із повторною втратою вагітності та попереднім невдачею ЕКЗ, що чітко демонструє переваги пропозиції PGT-A як частини лікування різних видів безпліддя.*

**Ключові слова:** FISH, PGT-A, ЕКЗ, ДРТ, анеуплоїдія, повторна втрата вагітності, ідіопатичне безпліддя, невдача ЕКЗ.

**Вступ.** Успіх екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) залежить від багатьох факторів. Вік та анамнез пацієнтки, протокол суперовуляції, методи обробки еякуляту або біопсії яєчка, індивідуальна гормональна підтримка та перенесення ембріонів у матку — все це відіграє важливу роль у процесі імплантації ембріона та настанні вагітності (Zheng et al, 2011; Colls et al, 2012). Одним із ключових факторів серед них є якість перенесених ембріонів.

Широко відомо, що збільшення віку жінок, які проходять лікування за допомогою допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ), сильно корелює з підвищеним рівнем викидня та зниженим рівнем імплантації ембріонів. Це в першу чергу викликано залежним від віку зниженням якості ооцитів, що негативно впливає на компетенцію ембріонів. Механізм цього явища досі недостатньо вивчений, але вважається, що залежне від віку зниження фертильності, мабуть, безпосередньо пов'язане зі збільшенням частоти ембріональної анеуплоїдії (Munné et al, 1993). Хромосомно аномальні зачаття, здається, є не тільки головною причиною зниження фертильності, пов'язаної з віком, але й найважливішою причиною невдачі ЕКЗ (Greco et al, 2020). Деякі дослідження показали, що кількісні хромосомні аномалії присутні у 70 % зупинених ембріонів і морфологічно нормальних ембріонів на стадії дроблення у жінок старше 40 років (Munné et al, 1993). Інші дослідники показали, що з 1000 ембріонів і плодів близько 170 померли на ранніх стадіях розвитку або до народження, причому 40 % з них мали різні типи хромосомних аномалій (Schatten et al, 2014), найчастішою з яких була анеуплоїдія. Було показано, що анеуплоїдії в ембріонах людини мають сильну кореляцію з віком матері та знижують фолікулярний резерв (Franasiak et al, 2014) і, як вважають, походять від хромосомних помилок, які виникають на різних стадіях оогенезу та розвитку ембріонів.

Щоб зменшити повторну втрату вагітності (ПВВ) під час ЕКЗ та підвищити шанси на

успішне лікування Gianaroli та його колеги (1997) запропонували переїмплантаційну генетичну діагностику з використанням флуоресцентної *in situ* гібридизації (FISH) на бластомерах, отриманих від ембріонів 3-го дня. Сьогодні процедура переїмплантаційного аналізу ембріона на кількісні хромосомні аномалії називається PGT-A (від англ. preimplantation genetic testing for aneuploidies).

До винаходу PGT-A основним методом відбору ембріонів для перенесення був морфологічний метод. Цей метод заснований на оцінці ембріонів за низкою візуальних критеріїв за шкалою від А до D, де А – ембріон найкращої якості, а D – ембріон незадовільної якості (Álvarez et al, 2013; Elsayed et al, 2013). Пізніше морфологічний метод був удосконалений шляхом постійного моніторингу стадій розвитку ембріона за допомогою спеціального приладу – ембріоскопа (Sciorio et al, 2021). На жаль, досить велика частка ембріонів з хорошою морфологією виявляється анеуплоїдними (Franasiak et al, 2014; Sahin et al, 2014). Застосування PGT-A може мати велике значення для відбору ембріонів без кількісних хромосомних порушень (Greco et al, 2020).

Впродовж останніх двадцяти років PGT-A продемонстрував багато перспектив для відбору ембріонів гарної якості для перенесення, таким чином підвищивши рівень успіху процедури ЕКЗ (Maxwell and Grifo, 2018). Аналіз PGT-A можна зробити шляхом біопсії полярного тільця (ПТ) яйцеклітини, біопсії бластомерів ембріона (на 3-й день після запліднення) або біопсії трофектодерми (ТЕ) ембріона (на 5-й день після запліднення). Біопсія ПТ надає лише інформацію про хромосому матері і не враховує аномалії мітотичного ділення (Newmann et al, 2020). Біопсія ТЕ ембріона дає хромосомну інформацію не тільки про обох батьків, але, що найважливіше, про плід. Біопсія бластомерів або ТЕ стала методом вибору в багатьох країнах, де не існує законодавчих обмежень щодо генетичної оцінки ембріонів. У країнах, де діють такі обмеження, єдиним способом для PGT-A є біопсія ПТ. Після біопсії хромосоми в отриманому ембріональному матеріалі можна візуалізувати безпосередньо за допомогою FISH (використовуючи специфічні для хромосом флуоресцентні зонди) або проаналізувати

а допомогою конкурентної геномної гібридизації на ДНК мікрочипах (aCGH) або методів секвенування наступного покоління (NGS) (Homer, 2019).

Найпоширенішими типами кількісних хромосомних аномалій, які спостерігаються за допомогою PGT-A, є моносомії та трисомії. Деякі анеуплоїдії, такі як трисомії хромосом 21, 18 і 13 (відповідно синдром Дауна, синдром Едвардса і синдром Патау) можуть не завдати шкоди прогресу плода до пологів, але все одно викликають серйозні постнатальні розлади. Хромосомні аберації (транслокації, делеції, кільцеві хромосоми тощо) також можуть бути причиною внутрішньоутробної загибелі плода, але обговорення їх ролі виходить за рамки цієї роботи.

Незважаючи на недавнє зростання популярності, застосування PGT-A залишається дискусійним у медичній спільноті (Esfandiari et al, 2016; Gleicher et al, 2016). У науковій літературі досі не існує єдиної думки щодо ефективності використання PGT-A у рамках програми ЕКЗ (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2016). Деякі дослідження показують, що використання PGT-A не збільшує відсоток успішності ЕКЗ (Schmutzler et al, 2014). Різні дослідники відзначають, що хоча PGT-A здатний виявляти багато хромосомних аномалій, він має мінімальний вплив, якщо такий є, на клінічну частоту вагітності (Munné et al, 2005; Meyer et al, 2009; Zheng et al, 2011; Staessen et al, 2014) та загальний рівень живонароджень (ЖН) порівняно зі стандартним ЕКЗ лікуванням (Mersereau et al, 2008; Rubio et al, 2017; Verpoest et al, 2018). Homer (2019) вказує на те, що широке використання цього дорогого доповнення до ЕКЗ поки не виявилось ефективним або навіть без шкоди.

Інші дослідження, навпаки, вказують на покращення репродуктивного результату, коли PGT-A використовується для відбору ембріонів. Чітко було показано, що PGT-A має позитивний вплив на успіх імплантації навіть після перенесення одного ембріону, досягаючи майже 80 % (Scott et al, 2013), і таким чином зменшує практику перенесення кількох ембріонів (Forman et al, 2012). Хоча PGT-A, схоже, не збільшує загальні шанси на народження живої дитини (Rubio et al, 2017), він підвищує рівень

ЖН на перенесений ембріон (Schoolcraft et al, 2009; Forman et al, 2013). У контрольованому рандомізованому дослідженні PGT-A порівняно зі звичайним ЕКЗ Scott з колегами (2013) спостерігали значно вищий рівень вагітності в когорті пацієнтів з PGT-A (66,4 %) порівняно з 47,9 % у контрольній групі. Подібні результати також повідомляють Yang і колеги (2012), які спостерігали значно вищі показники вагітності після перенесення свіжих ембріонів у пацієнтів з PGT-A порівняно з контролем (69,1 проти 41,7 %). Після скринінгу PGT-A пацієнти мають, як правило, менше імплантацій ембріонів за цикл, потребують меншої кількості імплантації і мають низький рівень викиднів (Rubio et al, 2017). Schmutzler (2019) окреслив цілі використання PGT-A в практиці ДРТ не тільки для досягнення збільшення частоти вагітності, але й для мінімізації викиднів, багатоплідної вагітності та вад розвитку, а також для зменшення випадків безглузлого лікування за допомогою ДРТ.

Метою цього дослідження було оцінити ефективність PGT-A у пацієнтів із попереднім невдачею ЕКЗ, ПБВ, ідіопатичним безпліддям та безпліддям, зумовленим іншими причинами. Щоб уникнути заморожування ембріонів, було вирішено проводити біопсію бластомерів на 3-й день у поєднанні з аналізом PGT-A за допомогою FISH, з подальшим перенесенням ембріонів на 5-й день. Результати дають інформацію щодо ефективності використання PGT-A у приватному клінічному середовищі ЕКЗ і будуть корисними як керівництво для фахівців щодо стратегії лікування за допомогою ДРТ, а також для консультування пацієнтів щодо PGT-A скринінгу.

**Матеріали та методи.** *Експериментальна популяція.* Для дослідження було відібрано 150 подружніх пар, які звернулися за ЕКЗ лікуванням в Центральну клінічну лікарню м. Баку, Азербайджан. Пацієнтів було розподілено на чотири експериментальні та одну контрольну групи по 30 пар у кожній. Групу I склали пацієнтки з попереднім невдачею ЕКЗ, Групу II – пацієнтки з ПБВ (ПБВ визначали як два або більше послідовних викиднів на терміні гестації до 20 тижнів), Групу III – пацієнтки з ідіопатичним безпліддям та Групу IV – пацієнтки з іншими причинами безпліддя (ендо-

метріоз, синдром полікістозних яєчників, трубний фактор тощо). Контрольну Групу V склали пари, у яких чоловіки не мали жодних репродуктивних проблем, а деякі з яких взагалі мали дітей від попередніх стосунків, а також здорові жінки без попередніх спроб ЕКЗ, які мали дуже низький резерв яєчників або двосторонню оваріектомію в минулому і які вибрали лікування за допомогою донорських ооцитів (ДО). У цій групі ембріони були отримані шляхом запліднення ДО спермою партнера. Донорами ооцитів були здорові молоді жінки у віці від 20 до 30 років з доведеною фертильністю.

Перед проведенням ЕКЗ у всіх пацієнок було проведено дослідження на наявність ФСГ, ЛГ, Е2, ТТГ, fT<sub>3</sub>, fT<sub>4</sub>, пролактину, АМГ, тестостерону, анти-ТПО антитіл, TORCH-інфекції та інфекцій, що передаються статевим шляхом, ПАП-тест, периферичний каріотип та рівень вітаміну D у крові. Репродуктивні органи було обстежено за допомогою гістеросальпінгографії та гістероскопії з патогістологічним дослідженням зразка біопсії ендометрію. У чоловіків проводили підрахунок сперматозоїдів та вивчали їх морфологію. Крім того, було проведено хромосомний аналіз сперми методом FISH та дослідження фрагментації ДНК. Подружжя, де один з батьків був носієм моногенного захворювання чи мав аномальний каріотип, або де чоловік мав виражену астенозооспермію, були виключені з дослідження.

Усі пацієнтки експериментальної та контрольних груп мали порівнянну етіологію безпліддя, анамнестичні дані, індекс маси тіла, типи соматичних та гінекологічних захворювань та перенесених у минулому оперативних втручань. Середній вік пацієнок становив  $35,5 \pm 1,0$  року, а тривалість безпліддя –  $7,5 \pm 5,0$  років.

*Протокол стимуляції та переносу.* Починаючи з 2-го або 3-го дня менструального циклу, пацієнткам проводили контрольовану стимуляцію яєчників відповідно до стандартного протоколу з використанням антагоністів (Andersen and Andersen, 2014; Lenth-Moller et al, 2014) із застосуванням рекомбінантного ФСГ у комбинації з hMG.

Стимуляцію контролювали за допомогою трансвагінального ультразвукового досліджен-

ня та рівня E2 в сироватці крові. Коли максимальний розмір фолікула досягав 14–15 мм, овуляцію викликали за допомогою 0,25 мг антагоніста ГнРГ. Ооцити були отримані через 35–36 год після введення тригера овуляції. Одразу після отримання яйцеклітин і сперматозоїдів була проведена їх морфологічна оцінка. Для запліднення відбирали зрілі ооцити з яскраво вираженим першим полярним тілом (стадія МІІ) (Baltaci et al, 2006; Colls et al, 2012).

Усі ооцити були запліднені за допомогою процедури інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда (ICSI). Якість отриманих ембріонів морфологічно оцінювали через 40–42 год (2 дні), 72–74 год (3 дні) та 120 год (5 днів) після запліднення.

Свіжий перенос ембріонів проводили на 5-й день після запліднення. Перед перенесенням якість бластоцист оцінювали за їх розміром за шкалою від 1 до 5, за станом внутрішньої

**Таблиця 1. Демографічні дані та дані щодо результативності отримання яйцеклітин та морфологічної і PGT-A оцінки ембріонів у всіх експериментальних групах**

Параметр	Значення
Клінічний показник вагітності в клініці без ПГТ-А	38,3 %
Загальна кількість пацієнтів	150
Кількість пацієнтів у групі дослідження (n)	30
Вік пацієнок, років (середнє ± SD)	35,5 ± 1,0
Тривалість безпліддя, років (середнє ± SD)	7,5 ± 5,0
Кількість використаних ооцитів (включаючи ДО)	2561
Кількість отриманих ембріонів	2350
Кількість ембріонів, проаналізованих PGT-A	1703
Кількість еуплоїдних ембріонів	781
Кількість морфологічно аномальних еуплоїдних ембріонів	90
Кількість анеуплоїдних ембріонів	922
Кількість морфологічно нормальних анеуплоїдних ембріонів	470
Кількість перенесених ембріонів	351
Кількість вітрифікованих ембріонів	340

клітинної маси (ВКМ), за шкалою від А до С, та за розміром клітин трофобласта за допомогою шкали від А до С (Álvarez et al, 2013; Papler et al, 2015; Yang et al, 2016;). Для перенесення були відібрані лише еуплоїдні ембріони за результатами PGT-A (див. нижче), розміром 3–5 мм з багатоклітинною ВКМ та розвиненим трофобластом. Середня кількість перенесених ембріонів у кожній досліджуваній групі становила 2,4 (група I, група III і група IV), 2,3 (група II) і 2,2 (група V).

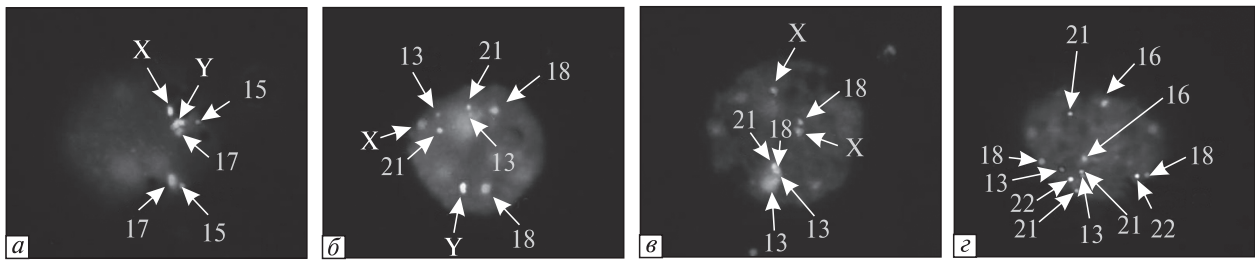
**Процедура PGT-A.** Біопсію бластоцист проводили на 3-й день після запліднення на стадії 6–10 бластомерів за допомогою клінічної лазерної системи Zilos-Tk (Hamilton Thorne, США). Сім аутосом та обидві статеві хромосоми були досліджені на кількісні відхилення за допомогою FISH і флуоресцентно мічених зондів Vysis (Abbot, США): LSI 13 (хромосома 13), CEP 15 (хромосома 15), CEP 16 (хромосома 16), CEP 1717), CEP 18 (хромосома 18), LSI 21 (хромосома 21), LSI 22 (хромосома 22), CEP X (X-хромосома) та CEP Y (хромосома Y).

**Статистичний аналіз.** Отримані дані обробляли за допомогою програмного комплексу Statistica 10 (StatSoft, США).

**Результати.** З 2561 ооцитів, отриманих для дослідження (включаючи ДО), 2350 ооцитів були зрілими і згодом взяті на запліднення ICSI (табл. 1). З 2350 ембріонів, отриманих таким чином, 1703 пройшли біопсію бластомеру на 3-й день культивування.

З 1703 ембріонів, проаналізованих PGT-A, 54,1 % (922 ембріони) були анеуплоїдними, включаючи 470 морфологічно нормальних ембріонів. У 90 випадках еуплоїдні ембріони мали морфологічні відхилення. Очевидно, що без ПГТ-А у більш ніж чверті випадків морфологічно нормальні анеуплоїдні ембріони були б випадково обрані для перенесення, що могло б призвести до невдачі ЕКЗ або народження дитини з хромосомним синдромом.

Приклад PGT-A з використанням FISH наведено на рисунку. Анеуплоїдії аутосом 15 і 18 та обох статевих хромосом були найчастіше виявлені в досліджуваних ембріонах, тоді як анеуплоїдія хромосоми 17 була найменш поширеною, жодна спостерігається в групах IV і V (табл. 2). Більшість анеуплоїдій було виявлено у пацієнтів із попередньою невдачею



**Рис. 1.** Приклади FISH PGT-A бластомерів людини 3-го дня: *а* – еуплоїдний каріотип (46,XY); *б* – еуплоїдний каріотип (46,XY); *в* – Каріотип із моносомією 21 (45,XX,-21); *г* – Каріотип із трисомією 21 (47,XX,+21). Цифри позначають відповідні хромосоми людини

ЕКЗ та ідіопатичним безпліддям. Кількість анеуплоїдій, що спостерігалися в контрольній групі, становила менше чверті тих, що спостерігалися в групах I і IV, і близько третини тих, що спостерігалися в групі II.

Анеуплоїдія хромосоми 18 була однією з найменш частих у групі I, але була найбільш поширеною в інших експериментальних групах. Цікаво, що в контрольній групі вона була виявлена майже в 35 % випадків – найвищий рівень серед усіх досліджуваних груп пацієнтів.

Анеуплоїдія хромосоми 15 достовірно частіше спостерігалася у ембріонів пацієнтів груп

I, II та IV порівняно з контрольною групою V ( $p < 0,05$ ). Число кількісних аномалій хромосоми 16 достовірно відрізнялася у пацієнтів груп I та III та пацієнтів груп IV та V ( $p < 0,05$ ).

Результати включення PGT-A в схему лікування ЕКЗ представлені в табл. 3. У всіх експериментальних групах частота вагітності була вище середньої клінічної частоти вагітності без PGT-A в нашій клініці (38,3 %), але, за винятком пацієнтів з ПБВ, де він становив 63,3 %, був нижчим, ніж у контрольній групі V (60,0 %,  $p < 0,05$ ).

**Таблиця 2.** Число спостережених кількісних хромосомних аномалій в залежності від хромосоми

Хромосома	Кількість спостережуваних анеуплоїдних ембріонів		Група I		Група II		Група III		Група IV		Група V	
	Кількість	% від загальної кількості на групу	Попередня невдача ЕКЗ		Повторна втрата вагітності		Ідіопатичне безпліддя		Інші причини		Контроль (донорські ооцити)	
			Кількість	% від загальної кількості на групу	Кількість	% від загальної кількості на групу	Кількість	% від загальної кількості на групу	Кількість	% від загальної кількості на групу	Кількість	% від загальної кількості на групу
13	52	5,6	14	4,8	16	7,5	12	4,6	8	8,4	2	3,1
15	183	19,8	85	29,4	45	21,0	25	9,6	20	21,1	8	12,5
16	65	7,0	27	9,3	7	3,3	27	10,4	2	2,1	2	3,1
17	20	2,2	8	2,8	6	2,8	6	2,3	0	0,0	0	0,0
18	175	19,0	17	5,9	55	25,7	58	22,3	23	24,2	22	34,4
21	71	7,7	22	7,6	12	5,6	25	9,6	7	7,4	5	7,8
22	69	7,5	17	5,9	23	10,7	16	6,2	8	8,4	5	7,8
X	158	17,1	50	17,3	35	16,4	45	17,3	15	15,8	13	20,3
Y	129	14,0	49	17,0	15	7,0	46	17,7	12	12,6	7	10,9
Всього	922	100,0	289	100,0	214	100,0	260	100,0	95	100,0	64	100,0

Від 21 до 29 % всіх клінічних вагітностей, які спостерігалися у пацієток груп I–IV, закінчувалися викиднями. У контрольній групі V рівень невиношування вагітності був найнижчим (16,7 %), що свідчить про наявність деяких інших причин втрати вагітності у пацієнтів груп I–IV, крім ембріональної анеуплоїдії. Принаймні 30 % випадків ЕКЗ призводило до ЖН. Найвищий рівень народжуваності спостерігався у пацієнтів з ПБВ та контрольної групи (50,0 %), тоді як у жінок із попереднім невдачею ЕКЗ цей результат спостерігався у 36,7 % випадків.

**Обговорення.** Вибір найкращого ембріона для перенесення має вирішальне значення для успішного результату процедури ЕКЗ. Оцінка ембріонального хромосомного матеріалу перед перенесенням не тільки підвищує шанси на успішну вагітність і ЖН (Rubio et al, 2013), але також мінімізує ризик розвитку кількісних хромосомних аномалій плода (Homer, 2019; Schmutzler, 2019;). У цьому дослідженні ми

вивчали вплив PGT-A на ці показники та його ефект на вагітність та частоту ЖН у пацієнтів із попередньою невдачею ЕКЗ, ПБВ, ідіопатичним безпліддям та іншими репродуктивними проблемами.

Основний висновок наявної роботи полягає в тому, що PGT-A має помітний вплив на прогрес ембріона до пологів. Після PGT-A частота настання вагітності після перенесення свіжих ембріонів у всіх експериментальних групах була вищою, ніж у нашій клініці без PGT-A. Достовірні відмінності в клінічній частоті вагітності спостерігалися для пацієнтів з ПБВ (63,3 % проти 38,3 %,  $P = 0,05$ ) та контрольної групи (60,0 проти 38,3 %,  $P = 0,05$ ). Подібне збільшення частоти вагітностей після PGT-A спостерігали Yang з колегами (2012) – 69,1 % після PGT-A проти 41,7 % у контрольній групі ( $P = 0,009$ )

В експериментальних групах I–IV ми не тільки спостерігали клінічну вагітність у більш ніж половини пацієток, але й у всіх групах

Таблиця 3. Результати ЕКЗ з PGT-A

Результат ЕКЗ	Група I		Група II		Група III		Група IV		Група V	
	Попередня невдача ЕКЗ		Повторна втрата вагітності		Ідіопатичне безпліддя		Інші причини		Контроль	
	Кількість	% від загальної кількості на групу	Кількість	% від загальної кількості на групу	Кількість	% від загальної кількості на групу	Кількість	% від загальної кількості на групу	Кількість	% від загальної кількості на групу
Загальна кількість хворих	30		30		30		30		30	
Середня кількість перенесених ембріонів	2,4		2,3		2,4		2,4		2,2	
Вагітність не наступила	16	53,3	11	36,7	18	60,0	16	53,3	12	40,0
Клінічна вагітність	14	46,7	19	63,3	12	40,0	14	46,7	18	60,0
Втрата вагітності (всі причини)	3	21,4	4	21,1	3	25,0	4	28,6	3	16,7
Живонародження	11	78,6 <sup>а</sup> 36,7 <sup>б</sup>	15	78,9 50,0	9	75,0 30,0	10	71,4 33,3	15	83,3 50,0

Примітка. а – від кількості клінічних вагітностей; б – від кількості пацієнтів у групі.

досягли живонародження. У пацієнтів з ПБВ половина циклів ЕКЗ привела до народження здорової дитини — така ж частка, як і в контрольній групі. В інших експериментальних групах результат ЖН спостерігався щонайменше в 30 % усіх циклів. Без PGT-A ці пацієнти не могли мати дитину навіть після кількох циклів ЕКЗ у минулому.

У випадках з невідомим генетичним ризиком хромосомний скринінг часто проводять на предмет поширених генетичних патологій, пов'язаних з аутосомами 13, 15, 16, 17, 18, 21 і 22, а також статевими хромосомами X і Y. У нашому дослідженні найвища частота анеуплоїдії виявлена в групах з попереднім невдачею ЕКЗ, ідіопатичним безпліддям і ПБВ. Анеуплоїдії за аутосомами 15 і 18 були найбільш поширеними в двох останніх дослідних групах і в контрольній. У пацієнтів із попередньою невдачею ЕКЗ кількісні хромосомні аномалії за хромосомою 15 становили майже 30 % усіх спостережуваних анеуплоїдій. У всіх групах анеуплоїдії за статевими хромосомами становили близько третини всіх кількісних аномалій. Анеуплоїдії за хромосомою X загалом зустрічалися частіше, ніж за хромосомою Y. У пацієнтів з ПБВ та в контролі частота анеуплоїдії за хромосомою X була вдвічі більшою, ніж за хромосомою Y.

Загалом у нашому дослідженні 54,1 % проаналізованих ембріонів виявлено анеуплоїдними за допомогою FISH PGT-A. Це схоже на рівень анеуплоїдії ембріонів у 44,9 %, який раніше спостерігали Yang і його колеги (2012) за допомогою aCGH PGT-A.

Ефект PGT-A був особливо виражений у пацієнтів з ПБВ. Приблизно 5 % усіх пар, які проходять лікування ЕКО, страждають від повторної втрати вагітності (Gresco et al, 2020). Існує величезна кількість наукових доказів, що вказують на більш високий рівень анеуплоїдії у пацієнтів з ПБВ (Vianco et al, 2006). Давно відомо, що анеуплоїдія є однією з головних причин викиднів на ранніх термінах. Більше 50 % спонтанних абортів мають продукти зачаття з хромосомними аномаліями. Хромосомні аномалії були виявлені у 70 % зупинених ембріонів і 70 % морфологічно нормальних ембріонів на стадії дроблення у жінок (Maxwell, 2018). У нашому дослідженні

ми спостерігали більш ніж у три рази більше анеуплоїдій у цього типу пацієнтів порівняно з контрольною групою. Після відбору еуплоїдних ембріонів з PGT-A втрата вагітності в ПБВ була найнижчою серед чотирьох експериментальних груп (21,1 %), але все ще вищою, ніж у пацієток з контрольної групи. Це може свідчити про те, що окрім генетичних, присутні й інші причини підвищеної частоти викиднів, як це було відзначено раніше іншими авторами (Liu, et al, 2020). На підтвердження попередніх досліджень (Sato et al, 2019) ми також виявили позитивний вплив PGT-A на частоту ЖН у цих пацієнтів. Когорта ПБВ показала другий за рівнем показник ЖН після контрольної: майже 79 % клінічних вагітностей привели до народження здорової дитини.

Як контрольну групу ми використовували пацієнтів, які по різним причинам обрали ДО для лікування безпліддя. Донорські ооцити зазвичай збирають у молодих (20–30 років), здорових жінок з доведеною фертильністю. Незважаючи на те, що вік донора повинен забезпечувати якість ооцитів, багато досліджень показують, що навіть у молодих жінок спостерігається значна кількість анеуплоїдних ембріонів (Masbou et al, 2019). Деякі дослідження показують, що рівень анеуплоїдії ембріонів, отриманих з ДО, досягає 53,2 % (Sills et al, 2014). У нашому дослідженні 64 ембріони контрольної групи V були виявлені анеуплоїдними, причому найчастіше спостерігалася анеуплоїдія хромосоми 18. Після PGT-A клінічний рівень вагітності у цих пацієток досяг 60 %, а половина циклів ЕКЗ призводила до ЖН. Цей результат вказує на те, що скринінг PGT-A на кількісні хромосомні аномалії також може бути корисним для підвищення ефективності циклів ДО.

У рамках протоколу ЕКЗ жінкам у всіх групах пацієнтів перенесли два, а часто і три ембріони. Така практика, як правило, небажана, оскільки може призвести до багатоплідної вагітності та багатоплідних пологів із такими несприятливими наслідками, як підвищений ризик викидня, підвищений ризик ускладнень як у матері, так і у плода, низька вага при народженні або передчасні пологи. Останні дослідження також показують, що збіль-

шення кількості перенесених ембріонів не обов'язково призводить до збільшення частоти настання вагітності (Dahan and Tannus, 2020). У деяких країнах навіть існує законодавче регулювання, яке обмежує кількість перенесених ембріонів двома за цикл ЕКЗ (Masschaele et al, 2012). Введення PGT-A в протокол ЕКЗ відкриває шлях до переходу від перенесення декількох ембріонів до перенесення одного ембріону, таким чином мінімізуючи вищевказані ризики і водночас досягаючи дуже високих показників імплантації (Scott et al, 2013) і хороших клінічних результатів вагітності (Greco et al, 2020).

Дані, отримані в цьому дослідженні, чітко демонструють перевагу пропонувати PGT-A пацієнтам з різними типами безпліддя. Скринінг ембріонів перед перенесенням за допомогою PGT-A дозволив отримати успішну клінічну вагітність у пацієнтів із попередніми невдалими циклами ЕКЗ та досягти живого народження у пацієнтів із принаймні двома попередніми ідіопатичними втратами вагітності. Наше дослідження підтверджує попередні спостереження про те, що PGT-A можна використовувати не тільки для огляду та діагностики, щоб досягти вагітності та зменшити шанси на викидень, але й як ефективний засіб лікування пацієнтів з ЕКЗ (Hodez-Wertz et al, 2012).

Отримані результати показують корисність включення передімплантаційного скринінгу ембріонів на анеуплоїдію в програму ЕКЗ. Завдяки своїм широким діагностичним можливостям, використання PGT-A в рамках ДРТ дозволяє відбирати для перенесення ембріони без чисельних хромосомних аномалій, що знижує ризик викидня та багатоплідної вагітності, підвищує шанси на успішну імплантацію та сприяє досягненню народження здорової дитини у пацієнтів з попередньою невдачею ЕКЗ.

**Дотримання етичних стандартів.** Відповідно до чинного законодавства Азербайджанської Республіки від усіх учасників дослідження було отримано попередню інформовану письмову згоду на використання експериментальних результатів у наукових цілях та публікацію в анонімному вигляді.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ в державному, комерційному або некомерційному секторах.

#### DETECTION OF CHROMOSOMAL ANEUPLOIDIES IN HUMAN BLASTOMERES USING FISH INCREASES SUCCESS OF IVF BY IMPROVING THE CHANCES OF EMBRYO PROGRESS TO DELIVERY

A. Semikhodskii, M. Ismayilova

Medical Genomics Ltd, London, UK  
134 Somerset Road, London, SW19 5HP, UK  
Central Clinic Hospital  
76 Parliament Ave., Baku, Azerbaijan AZ1006  
E-mail: andrei@medicalgenomics.co.uk,  
mahiremk@hotmail.com

Efficiency of PGT-A have been studied in patients with previous IVF failure, recurrent pregnancy loss, idiopathic infertility and infertility due to other causes. More than 50 % of all embryos produced in four experimental and one control groups were found to be aneuploid. Aneuploidies of autosomes 15 and 18 and of both sex chromosomes were the ones most frequently observed. Most aneuploidies were detected in patients with previous IVF failure and idiopathic infertility. After selecting euploid embryos for transfer high clinical pregnancy rates were achieved in all study groups. In at least 30 % of patients in each study group IVF treatment coupled with PGT-A resulted in live birth. The highest live birth rate was observed in patients with recurrent pregnancy loss and previous IVF failure thus clearly demonstrating the benefits of offering PGT-A as part of treatment for various types of infertility.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Andersen CY, Andersen KV. (2014) Improving the luteal phase after ovarian stimulation: reviewing new options *Reprod Biomed Online* 28(5):552–9. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.01.012
- Álvarez C, García-Garrido C, Taronger R, González de Merlo G. (2013) In vitro maturation, fertilization, embryo development & clinical outcome of human metaphase-I oocytes retrieved from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles *Indian J Med Res* 137(2):331–338
- Baltaci V, Satiroglu H, Kabukçu C, Unsal E, Aydinuraz B, Uner O, Aktas Y, Cetinkaya E, Turhan F, Aktan A. (2006) Relationship between embryo quality and aneuploidies *Reprod Biomed Online* 12(1):77–82. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60984-4
- Bianco K, Caughey AB, Shaffer BL, Davis R, Norton



- ME. (2006) History of miscarriage and increased incidence of fetal aneuploidy in subsequent pregnancy *Obstet Gynecol* 107(5):1098–1102. doi: 10.1097/01.AOG.0000215560.86673.22
- Colls P, Escudero T, Fischer J, Cekleniak NA, Ben-Ozer S, Meyer B, Damien M, Grifo JA, Hershlag A, Munné S. (2012) Validation of array comparative genome hybridization for diagnosis of translocations in preimplantation human embryos *Reprod Biomed Online* 24(6):621–629. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.02.006
- Dahan, M.H., Tannus, S. (2020) Believing that transferring more embryos will result in increased pregnancy rates: a flawed concept: a SWOT analysis *Middle East Fertil Soc J* 25:32. doi: 10.1186/s43043-020-00042-3
- Elsayed GM, El Assiouty L, El Sobky ES. (2013) The importance of rapid aneuploidy screening and prenatal diagnosis in the detection of numerical chromosomal abnormalities *Springerplus* 29(2):490. doi: 10.1186/2193-1801-2-490
- Esfandiari N, Bunnell ME, Casper RF. (2016) Human embryo mosaicism: did we drop the ball on chromosomal testing? *J Assist Reprod Genet* 33(11):1439–1444. doi: 10.1007/s10815-016-0797-y
- Ferraretti AP, Magli MC, Kopcow L, Gianaroli L. (2004) Prognostic role of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in assisted reproductive technology outcome *Hum Reprod* 19(3):694–699. doi: 10.1093/humrep/deh121
- Forman EJ, Hong KH, Treff NR, Scott RT. (2012) Comprehensive chromosome screening and embryo selection: moving toward single euploid blastocyst transfer *Semin Reprod Med* 30(3):236–242. doi: 10.1055/s-0032-1311526
- Forman EJ, Upham KM, Cheng M, Zhao T, Hong KH, Treff NR, Scott RT Jr. (2013) Comprehensive chromosome screening alters traditional morphology-based embryo selection: a prospective study of 100 consecutive cycles of planned fresh euploid blastocyst transfer *Fertil Steril* 100(3):718–724. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.043
- Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott RT Jr. (2014) The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening *Fertil Steril* 101(3):656–663. e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.11.004
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Garrisi J, Munné S. (1997) Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos *Fertil Steril* 68(6):1128–1131. doi: 10.1016/s0015-0282(97)00412-3
- Gleicher N, Vidali A, Braverman J, Kushnir VA, Barad DH, Hudson C, Wu YG, Wang Q, Zhang L, Albertini DF. (2016) International PGS Consortium Study Group. Accuracy of preimplantation genetic screening (PGS) is compromised by degree of mosaicism of human embryos *Reprod Biol Endocrinol* 5;14(1):54. doi: 10.1186/s12958-016-0193-6
- Greco E, Litwicka K, Minasi MG, Cursio E, Greco PF, Barillari P. (2020) Preimplantation Genetic Testing: Where We Are Today *Int J Mol Sci* 21(12):4381. doi: 10.3390/ijms21124381
- Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S, Kaplan B, Laskin CA, Glassner M, Munné S. (2012) Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos *Fertil Steril* 98(3):675–680. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.05.025
- Homer HA. (2019) Preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): The biology, the technology and the clinical outcomes *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 59(2):317–324. doi: 10.1111/ajo.12960.
- Leth-Moller K, Hammer Jagd S, Humaidan P. (2014) The Luteal Phase after GnRHα Trigger-Understanding An Enigma *Int J Fertil Steril* 8(3):227–234
- Liu XY, Fan Q, Wang J, Li R, Xu Y, Guo J, Wang YZ, Zeng YH, Ding CH, Cai B, Zhou CQ, Xu YW. (2020) Higher chromosomal abnormality rate in blastocysts from young patients with idiopathic recurrent pregnancy loss *Fertil Steril* 113(4):853–864. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.11.016
- Masbou AK, Friedenthal JB, McCulloh DH, McCaffrey C, Fino ME, Grifo JA, Licciardi F. (2019) A Comparison of Pregnancy Outcomes in Patients Undergoing Donor Egg Single Embryo Transfers With and Without Preimplantation Genetic Testing *Rep Sci* 26(12):1661–1665. doi: 10.1177/1933719118820474
- Masschaele T, Gerris J, Vandekerckhove F, De Sutter P. (2012) Does transferring three or more embryos make sense for a well-defined population of infertility patients undergoing IVF/ICSI? *Facts Views Vis Obgyn* 4(1):51–58
- Maxwell SM, Grifo JA. (2018) Should every embryo undergo preimplantation genetic testing for aneuploidy? A review of the modern approach to in vitro fertilization *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 3:38–47. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.07.005
- Mersereau JE, Pergament E, Zhang X, Milad MP. (2008) Preimplantation genetic screening to improve in vitro fertilization pregnancy rates: a prospective randomized controlled trial *Fertil Steril* 200 90(4):1287–1289. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.08.010

- Meyer LR, Klipstein S, Hazlett WD, Nasta T, Mangan P, Karande VC. (2009) A prospective randomized controlled trial of preimplantation genetic screening in the «good prognosis» patient *Fertil Steril* 91(5): 1731–1738. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.02.162
- Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. (1993) Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos *Hum Rep* 8(12):2185–2191. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138001
- Munné S, Velilla E, Colls P, Garcia Bermudez M, Vemuri MC, Steuerwald N, Garrisi J, Cohen J. (2005) Self-correction of chromosomally abnormal embryos in culture and implications for stem cell production *Fertil Steril* 84(5):1328–1334. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.06.025
- Papler TB, Bokal EV, Maver A, Lovrečić L. (2015) Specific gene expression differences in cumulus cells as potential biomarkers of pregnancy *Reprod Biomed Online* 30(4):426–433. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.12.011
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2016) Prevention and treatment of moderate and severe ovarian hyperstimulation syndrome: a guideline *Fertil Steril* 106(7):1634–1647. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.08.048
- Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Bosch E, Mercader A, Vidal C, De los Santos MJ, Giles J, Labarta E, Domingo J, Crespo J, Remohí J, Pellicer A, Simyn C. (2013) Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials *Fertil Steril* 99(5):1400–1407. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.11.041
- Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Castillyn G, Guill n A, Vidal C, Giles J, Ferrando M, Cabanillas S, Remohí J, Pellicer A, Simyn C. (2017) In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study *Fertil Steril* 107(5):1122–1129. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.03.011
- Sahin L, Bozkurt M, Sahin H, Ѓьrel A, Yumru AE. (2014) Is preimplantation genetic diagnosis the ideal embryo selection method in aneuploidy screening? *Kaohsiung J Med Sci* 30(10):491–498. doi: 10.1016/j.kjms.2014.05.008
- Sato T, Sugiura-Ogasawara M, Ozawa F, Yamamoto T, Kato T, Kurahashi H, Kuroda T, Aoyama N, Kato K, Kobayashi R, Fukuda A, Utsunomiya T, Kuwahara A, Saito H, Takeshita T, Irahara M. (2019) Preimplantation genetic testing for aneuploidy: a comparison of live birth rates in patients with recurrent pregnancy loss due to embryonic aneuploidy or recurrent implantation failure *Hum Rep* 34(12):2340–2348. doi: 10.1093/humrep/dez229
- Schatten H, Sun QY, Prather R. (2014) The impact of mitochondrial function/dysfunction on IVF and new treatment possibilities for infertility *Reprod Biol Endocrinol* 12:111. doi: 10.1186/1477-7827-12-111
- Schmutzler AG. (2019) Theory and practice of preimplantation genetic screening (PGS) *Eur J Med Genet* 62(8):103670. doi: 10.1016/j.ejmg.2019.103670
- Schmutzler AG, Acar-Perk B, Weimer J, Salmassi A, Sievers K, Tobler M, Mettler L, Jonat W, Arnold N. (2014) Oocyte morphology on day 0 correlates with aneuploidy as detected by polar body biopsy and FISH *Arch Gynecol Obstet* 289(2):445–450. doi: 10.1007/s00404-013-2944-3
- Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, Rawlins M, Munné S. (2009) Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial *Fertil Steril* 92(1):157–162. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.05.029
- Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, Tao X, Treff NR. (2013) Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial *Fertil Steril* 100(3):697–703. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.035
- Sciorio R, Thong D, Thong KJ, Pickering SJ. (2021) Clinical pregnancy is significantly associated with the blastocyst width and area: a time-lapse study *J Assist Reprod Genet* doi: 10.1007/s10815-021-02071-x
- Sills ES, Li X, Frederick JL, Khoury CD, Potter DA. (2014) Determining parental origin of embryo aneuploidy: analysis of genetic error observed in 305 embryos derived from anonymous donor oocyte IVF cycles *Mol Cytogenet* 7(1):68. doi: 10.1186/s13039-014-0068-5
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. (2004) Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial *Hum Reprod* 19(12):2849–2858. doi: 10.1093/humrep/deh536.
- Verpoest W, Staessen C, Bossuyt PM, Goossens V, Altarescu G, Bonduelle M, Devesa M, Eldar-Geva T, Gianaroli L, Griesinger G, Kakourou G, Kokkali G, Liebenthron J, Magli MC, Parriego M, Schmutzler AG, Tobler M, van der Ven K, Geraedts J, Sermon K. (2018) Preimplantation genetic testing for aneuploidy by microarray analysis of polar bodies in advanced maternal age: a randomized clinical

- Hum Reprod 33(9):1767–1776. doi: 10.1093/humrep/dey262
- Yang X, Huang R, Wang YF, Liang XY. (2016) Pituitary suppression before frozen embryo transfer is beneficial for patients suffering from idiopathic repeated implantation failure J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 36(1):127–131. doi: 10.1007/s11596-016-1554-2
- Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, Peck AC, Sills ES, Salem RD. (2012) Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study Mol Cytogenet 5(1):24. doi: 10.1186/1755-8166-5-24
- Zheng YM, Wang N, Li L, Jin F. (2011) Whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis J Zhejiang Univ Sci B 12(1):1–11. doi: 10.1631/jzus.B1000196

**СКОРОЧЕННЯ:**

- Анти-ТПО – Антитіла до пероксидази щитовидної залози
- АМГ – Антимюллерів гормон
- ВКМ – Внутрішня клітинна маса
- ГнРГ – Гонадотропін-релізінг-гормоніввві
- ДО – Донорський ооцит
- ДРТ – Допоміжні репродукційні технології
- ЕКЗ – Екстракорпоральне запліднення

- ЖН – Живонародження
- ЛГ – Лютеїнізуючий гормон
- ПАП – Тест за Папаніколау
- ПВВ – Повторна втрата вагітності
- ПТ – Полярне тільце
- ТЕ – Трофктодерма
- ТТГ – Тиреотропний гормон
- ФС – Фолікулостимулюючий гормон
- aCGH – Конкурентна геномна гібридизації на ДНК мікрочипах
- E2 – Естрадіол
- fT<sub>3</sub> – Вільний трийодтиронін
- fT<sub>4</sub> – Вільний тироксин
- FISH – Флуоресцентна *in situ* гібридизація
- hMG – Менопаузний гонадотропін людини
- ICSI – інтрацитоплазматична ін'єкція сперматозоїда
- NGS – секвенування нового покоління
- PGT-A – Переїмплантаційне генетичне тестування на анеуплоїдію
- SD – стандартне відхилення
- TORCH – токсоплазмоз, інші (сифіліс, вітряна віспа, парвовірус В19), краснуха, цитомегало вірус (ЦМВ) та герпетичні інфекції

Надійшла в редакцію 10.07.21  
Після доопрацювання 14.10.21  
Прийнята до друку 18.05.22