

УДК 575.191:616–056.714–08:618.177–089.888.11–035

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОГО СКРИНИНГА В ПРОГРАММАХ ЭКО С ICSI У СУПРУЖЕСКИХ ПАР СТАРШЕ 35 ЛЕТ

М.И. КОНОНЕНКО¹, С.В. ДЕНИСЕНКО¹, Н.Г. ГОРОВЕНКО²

¹ Клиника проблем планирования семьи

Украина, 03037, Краснозвездный проспект, 17

² Национальная Медицинская Академия последипломного образования

имени П.Л. Шупика

Украина, 04112, ул. Дорогожицкая, 9

e-mail: info@icsi.com.ua

Цель. Провести ретроспективный анализ результатов преимплантационного скрининга эмбрионов на 3-й день развития *in vitro*, полученных в программах ЭКО с ICSI у супружеских пар старшей возрастной группы. **Методы.** Клиническое обследование, спермиологический анализ, цитогенетическое исследование, морфологическая оценка эмбрионов, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). **Результаты.** Проведена оценка эффективности метода выявления геномных мутаций у эмбриона до имплантации. Молекулярно-цитогенетический анализ всех клеток эмбрионов, отнесенных к анеуплоидным после преимплантационной диагностики, показал преобладание мозаичных эмбрионов (63,6 %). **Выводы.** Результаты собственных и литературных данных свидетельствуют о том, что внедрение тестирования в качестве скрининга наиболее распространенных геномных мутаций на преимплантационном уровне нецелесообразно в связи с высоким уровнем мозаицизма.

Ключевые слова: преимплантационный генетический скрининг, FISH, анеуплоидия, мозаицизм, возрастной фактор.

Введение. Преимплантационный генетический скрининг (ПГС) проводится для выявления геномных мутаций у эмбриона до его имплантации с целью повышения эффективности лечебных циклов программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) у супружеских пар с нарушением репродуктивной функции [1]. Показаниями для проведения ПГС являются: возраст супруги старше 35 лет, отягощенный анамнез (невынашивание беременности, мертворождение, рождение ребенка с хромосомной патологией), мужской фактор бесплодия, отсутствие имплантации в нескольких циклах лечебных программ ВРТ, проведение одному из супругов курса радиотерапии [1, 2]. Диагностика геномных мутаций до переноса эмбриона в матку, по мнению ученых, снижает процент потерь на ранних сроках беременности и риск рождения ребенка с хромосомной патологией. Отдельные авторы рекомендуют проводить ПГС во всех без исключения лечебных программах для повышения эффективности ВРТ и в качестве замены пренатальной инвазивной диагностики [3, 4].

Обоснованием для проведения ПГС супружеским парам старшей возрастной группы является установленная связь между возрастом матери и частотой

нерасхождения хромосом во время первого или второго мейотического деления, – у женщин старше 40 лет процент анеуплоидных ооцитов достигает 70 % [5, 6]. Для сравнения – частота встречаемости анеуплоидии в сперматозоидах нормальных фертильных мужчин составляет 4–7 % [7].

ПГС преимущественно проводят с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) клонированных последовательностей ДНК [1, 8]. Объектами исследования являются первое (второе) полярное тельце, бластомеры делящегося эмбриона, клетки морулы и бластоцисты. За последнее десятилетие ПГС получил широкое распространение, составляя 75 % всех процедур преимплантационной генетической диагностики в США и 65 % в Западной Европе [9]. В большинстве случаев ПГС используют в связи с таким показателем, как возрастной фактор [1].

Наряду с положительной оценкой ряд исследователей высказывается против широкого использования ПГС [10–12]. Среди спорных вопросов выделяют явление мозаицизма хромосом на данной стадии развития эмбриона и связанную с ним ошибочную селекцию эмбриона в процедуре ПГС [11–12]. Цель данного исследования – определить достоверность информации о хромосомном наборе эмбриона на основе анализа одного бластомера, сопоставить собственные данные с данными литературы. В Украине подобные исследования не проводились.

Материалы и методы

Проведен ретроспективный анализ результатов ПГС эмбрионов, полученных с помощью лечебной программы ЭКО с ICSI. Показанием для ПГС явилось желание супружеских пар в связи с возрастом, оформленное в виде информированного согласия. Были обследованы 153 супружеские пары. Средний возраст женщин составил 37,2 года (от 35 до 39 лет).

Кариотип обоих супругов и показатели спермиалогического анализа мужа были в пределах нормы, преобладал (76 %) трубно-перитонийный фактор нарушений репродуктивной функции у женщин.

Материалом для исследования служили бластомеры 612 морфологически нормальных эмбрионов. ПГС проводили с помощью FISH. Алгоритм исследования включал ряд последовательных действий: морфологическую оценку эмбрионов перед забором клетки; аспирацию бластомера для анализа; фиксацию на предметном стекле; непосредственно гибридизацию *in situ*; анализ с последующим переносом эмбриона (эмбриотрансфер) с нормальными показателями; при выявлении анеуплоидии в одном бластомере – анализ всех клеток эмбриона; при отсутствии сигналов и/или ядра – повторная аспирация бластомера и его анализ (алгоритм проведения исследования представлен на рис. 1).

Морфологические особенности эмбрионов оценивали по количеству бластомеров, степени фрагментации, равномерности дробления, отсутствию/наличию вакуолей и других включений в цитоплазму, отсутствию/наличию многоядерных бластомеров. Из анализа исключали пяти-шести и более чем восьмиклеточные, фрагментированные (более 15 % фрагментации), с включениями в цитоплазме, а также многоядерные эмбрионы. Аспирацию одного бластомера проводили на 3-й день развития *in vitro* только у 7-ми или 8-клеточных эмбрионов. Анализировали только нативные (некриоконсервированные) эмбрионы. Для биопсии бластомеров использовали лазерную систему MTG.

Клетки фиксировали по методу Дозорцева [13]. FISH проводили согласно протоколу, предложенному Хардарсоном в собственной модификации [14, 15]. В работе использовали коммерческие ДНК зонды (околоцентромерные – для хромосом 18, X, Y; ло-

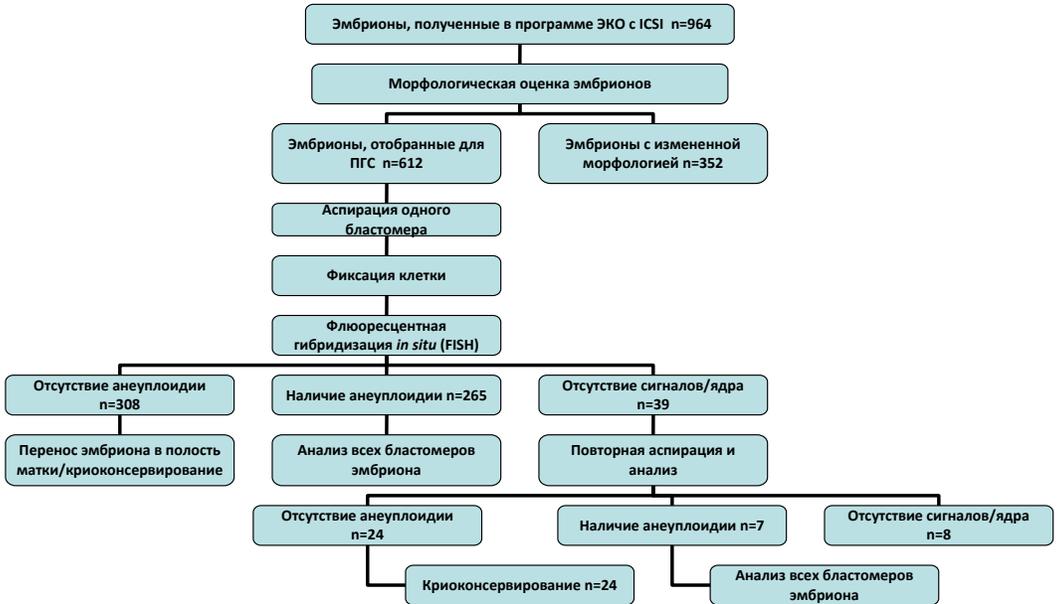


Рис. 1. Алгоритм проведения ПГС

кус-специфические – для хромосом 13 и 21) (Vysis, Abbott Molecular Inc, USA). Результаты гибридизации оценивали, определяя наличие/отсутствие сигналов и их количество. В каждом исследовании эффективность FISH тестировали на интерфазных ядрах препаратов лимфоцитов периферической крови здоровых лиц. Диплоидные эмбрионы переносили в полость матки пациентки/замораживали; анеуплоидные эмбрионы исследовали повторно, анализируя все бластомеры (рис. 1). После получения беременности проводили во всех случаях пренатальную инвазивную диагностику плода.

Интерпретация результатов повторного молекулярно-цитогенетического анализа была основана на следующих критериях: эмбрионы были отнесены к диплоидным при отсутствии анеуплоидии в большинстве бластомеров (1 клетка из 8 проанализированных может быть анеуплоидной); эмбрионы относились к анеуплоидным, если все или большинство бластомеров имели одинаковую хромосомную

патологию; к мозаичным были отнесены эмбрионы с диплоидными и анеуплоидными бластомерами (диплоид-анеуплоид мозаики), а также эмбрионы, бластомеры которых содержали различные анеуплоидии (хаотические мозаики) [16].

Результаты и обсуждение

Молекулярно-цитогенетический анализ был информативен для 573 эмбрионов из 612. В 6,38 % случаев (39 эмбрионов) результат не был получен в связи с отсутствием ядра/сигналов, трудностями при интерпретации сигналов. После повторной биопсии бластомера результат был получен для 31 ядра (рис. 1). Таким образом, были проанализированы 604 эмбриона (98,7 %) из 612. Согласно данным разных авторов, отсутствие результатов ПГС в связи с техническими ограничениями метода наблюдается от 3,2 % до 20,1 % случаев [8, 12]. Выделяют следующие причины ограничений: наложение сигналов или их близкое расположение, контаминация

кумуляционными клетками при недостаточной отмывке ядер, изменения в протоколе пре- и постгибридизации, приводящие к слабому свечению сигнала или его отсутствию [17]. Еще одна причина отсутствия результата при выполнении ПГС – разрушение или отсутствие самого ядра.

Молекулярно-цитогенетическое исследование 604 эмбриона на основании анализа одного бластомера показало следующее соотношение диплоидных и анеуплоидных эмбрионов: 332 эмбриона с диплоидным набором и 272 эмбриона с анеуплоидией. Согласно алгоритму исследования (табл. 1), при выявлении анеуплоидии в одном бластомере последующий этап исследования включал анализ всех клеток эмбриона. Результаты дополнительного молекулярно-цитогенетического анализа представлены в табл. 1.

Дополнительное молекулярно-цитогенетическое исследование 272-х эмбрионов позволило выявить мозаицизм у более чем половины из них: 121 эмбрион содержал анеуплоидные и диплоидные клетки и 52 эмбриона были идентифицированы как хаотические мозаики (наличие разных анеуплоидий в бластомерах). Такое пре-

Таблица 1. Результаты дополнительного молекулярно-цитогенетического анализа 272 эмбрионов

Хромосомный набор эмбрионов после дополнительного молекулярно-цитогенетического анализа n=272	N (%)
Диплоидный	21 (7,7 %)
Анеуплоидный	78 (28,7 %)
Мозаичный:	173 (63,6 %)
– наличие анеуплоидных и диплоидных бластомеров в эмбрионе	121
– наличие различных анеуплоидий в бластомерах одного эмбриона	52

обладание мозаицизма позволяет сделать предположение, что эмбрионы, отнесенные к диплоидным на основании анализа одного бластомера, представляют неоднородную группу и существует риск ложно-положительных и ложно-отрицательных результатов за счет не выявленных мозаичных эмбрионов. Решение этого вопроса исследователи видят в аспирации не одного, а двух бластомеров [18]. Однако Коуру с соавт. выявили снижение в два раза результативности программ ЭКО с ICSI среди супружеских пар, для которых проводили ПГС на двух бластомерах [19].

Согласно нашим результатам частота анеуплоидных эмбрионов составила 45,5 %. Сопоставляя полученные результаты с литературными данными, следует отметить, что анеуплоидию в эмбрионах, полученных в программах ВРТ у женщин старшей возрастной группы, выявляют с частотой 39,0–70,3 % [20–27] (см. табл. 2).

Таблица 2. Частота встречаемости анеуплоидии при проведении ПГС женщинам старшей возрастной группы (цит. по Zamora et al. [27])

Первоисточник	Возраст женщины, годы	Частота встречаемости анеуплоидии при проведении ПГС, %
Kahraman et al., 2000 [20]	≥ 35	39,0
Munne et al., 2002 [21]	35-39	58,9
Werlin et al., 2003 [22]	> 38	53,7
Staessen et al., 2004 [23]	≥ 37	63,2
Platteau et al., 2005 [24]	≥ 37	65,3
Rubio et al., 2005 [25]	≥ 38	70,3
Debrock et al., 2010 [26]	≥ 35	69,7
Собственные данные	35-39	45,5

Столь широкий диапазон показателя частоты анеуплоидии потребовал тщательного анализа литературных источников для выявления критериев отбора эмбрионов разными авторами. Было установлено, что авторы используют разные системы классификации эмбрионов, проводят анализ как 5–8-клеточных эмбрионов, так и бластоцист, анализируют нативные и после криоконсервирования эмбрионы. Также в цитируемых работах не унифицированы требования к отбору эмбрионов, различаются протоколы FISH и количество ДНК зондов.

Анализ всех бластомеров эмбриона позволил нам установить не только процентное соотношение анеуплоидных, мозаичных и нормальных эмбрионов, но и выявить варианты мозаицизма (табл. 1). В нашем исследовании преобладали мозаичные эмбрионы с диплоидным/анеуплоидным наборами хромосом (121 эмбрион из 173-х) (69,9 %).

Мозаицизм на преимплантационном уровне выявляют с частотой от 15 % до 90 % [11, 29–33]. Нами выделены следующие факторы, которые могут объяснить варьирование показателя мозаицизма: отсутствие единого подхода к определению мозаицизма; использование методов с различной разрешающей способностью; отсутствие единых требований при анализе данных. Ряд авторов называют мозаичным эмбрион при выявлении одной клетки с аномальным набором хромосом, тогда как другие исследователи принимают за мозаицизм только те эмбрионы, в которых не менее 50 % клеток с анеуплоидией [11, 28, 29, 34, 35]. На показателе частоты встречаемости анеуплоидии и мозаицизма отражаются разрешающие способности технологий, с помощью которых проводят скрининг анеуплоидии. Наиболее распространенным методом является FISH, с помощью которого проводится свыше 80 % исследований [11]. Количе-

ство анализируемых хромосом во время гибридизации *in situ* (<3, 3–5, 6–10, >10) и выбор ДНК зондов (на центромерные или уникальные последовательности ДНК) играют роль в проценте выявляемой хромосомной патологии. Согласно математической модели оценки FISH чувствительность метода составляет: 95–99 % на один зонд, 90 % на два зонда и 41 % при использовании 5 зондов одновременно [36]. С привлечением метода сравнительной геномной гибридизации (CGH) стало возможным анализировать все 23 пары хромосом, выявлять структурные хромосомные мутации, в том числе частичные анеуплоидии [37–40]. Разрешающая способность CGH метода на 15 % выше по сравнению с FISH [41]. Однако и эта технология не позволяет объективно оценить частоту встречаемости мозаичных эмбрионов – называют различные цифры: 24 %; 31 %; 57,7 % [6, 11, 35, 39, 40].

Также необходимо учитывать, какие эмбрионы используют для ПГС: нативные или после криоконсервирования; прошедшие отбор после морфологической оценки или нет, а также на какой стадии деления производят аспирацию клетки. Согласно наблюдениям Беланской М.М. с соавторами, в мозаичных эмбрионах соотношение диплоидных/анеуплоидных клеток меняется в зависимости от стадии дробления: мозаичные эмбрионы на 3-й день развития *in vitro* содержали в среднем 62 % диплоидных клеток, тогда как на 5-й день развития *in vitro* это соотношение составляло 74 % [42]. Последствия спонтанной коррекции мозаицизма можно наблюдать во время пренатальной диагностики плода, речь идет об ограниченном плацентарном мозаицизме – клетки плаценты содержат анеуплоидный клон, а плод имеет нормальный кариотип [43–45].

Мозаичные эмбрионы с диплоидным/анеуплоидным наборами хромосом могут

имплантироваться и дать развитие организму, при этом решающую роль в жизнеспособности эмбриона играет соотношение диплоидных и анеуплоидных клеток. Так, установлено, что потенциал эмбриона к имплантации и дальнейшему развитию с количеством анеуплоидных клеток менее 50 % достаточно велик [30].

Столь высокий процент мозаицизма среди эмбрионов на 3-й день развития *in vitro* ставит под сомнение целесообразность и безопасность биопсии, поскольку при проведении аспирации клетки для ПГС нарушается соотношение диплоидных и анеуплоидных клеток. Так, при аспирации диплоидной клетки у мозаичного эмбриона снижается шанс дальнейшего развития нормального эмбриона за счет увеличения соотношения клеток с анеуплоидией. И, наоборот, анализируя одну анеуплоидную клетку мозаичного эмбриона, исследователь делает заключение о хромосомном наборе всего эмбриона, исключая его из группы эмбрионов для имплантации, при этом шанс развития и коррекции анеуплоидии у такого эмбриона увеличивается, поскольку клетку с анеуплоидией аспирировали и процент клеток с анеуплоидией уменьшился.

Механизмы естественного отбора анеуплоидных и мозаичных эмбрионов до имплантации активно изучаются [16]. Установлено, что большая часть анеуплоидных и мозаичных эмбрионов элиминирует до момента имплантации. Высокий уровень анеуплоидии среди восьмиклеточных эмбрионов снижается до 30 %, выявляемых у спонтанных абортусов, до 20 % – у мертворожденных и 0,3 % – у новорожденных [46]. Эти цифры позволяют предположить, что во время гестации происходит процесс самосохранения плода, основанный на таких биологических явлениях, как апоптоз, контроль клеточного цикла [47]. Среди замерших абортусов 6–20 недель гестации мозаичный кариотип выявляют у

10 %, у плодов I триместра беременности – в 1–2 % случаев [16]. В качестве механизмов коррекции анеуплоидии ученые называют: клеточный арест или апоптоз анеуплоидной клетки и/или эмбриона; преимущественное деление диплоидных клеток по сравнению с анеуплоидными; анафазное отставание хромосомы; периферийное размещение анеуплоидных клеток [48]. Исследования *in vitro* дополняют данные о селекции клеток с анеуплоидией: линии стволовых клеток, полученные от эмбрионов с анеуплоидией, выявленной в ходе ПГС, имели нормальный кариотип [47]. Работы на модельных системах (мышах), показали аналогичные результаты: инъекция донорских стволовых клеток с незначительным процентом диплоидных клеток (20 % диплоидных и 80 % с хромосомными аномалиями) в тетраплоидные эмбрионы приводили к рождению нормальных животных с диплоидным набором хромосом [49].

К настоящему моменту ПГС с помощью FISH остается наиболее распространенным методом выявления геномных мутаций до имплантации эмбрионов, однако вопрос о широком использовании скрининга остается открытым. Предложены различные варианты выявления геномных мутаций, в том числе изучение хромосомного набора полярных теллец, использование других современных молекулярных технологий. Однако анализ первого и второго полярных теллец позволяет изучить исключительно материнский вклад в развитие генетической патологии [50, 51].

Выводы

Полученные результаты и анализ литературных данных показали, что определение генетического статуса эмбриона только на основе анализа одной клетки у эмбрионов на 3-й день развития *in vitro* ведет к ложно-положительным и ложно-отрицательным результатам. Высокий уровень

мозаицизма вызывает сомнение в целесообразности и безопасности широкого использования ПГС, т.к. вывод о хромосомном наборе эмбриона по одной клетке недостоверен, а шансы развития нормального эмбриона снижаются. Результаты нашего исследования согласуются с данными других авторов [10–12].

Процедура ПГС является инвазивной, поэтому ее следует применять исключительно при наличии показаний. Собственный опыт применения технологии преимплантационной диагностики свидетельствует о ее высокой эффективности в случаях молекулярной диагностики моногенной патологии в семьях высокого риска развития именно этой патологии, а также при наличии структурной перестройки у одного из родителей для выявления сбалансированного/несбалансированного кариотипа у эмбриона.

Внедрение преимплантационной диагностики в качестве скрининга требует устранения технических ограничений и получения ответа на ряд вопросов, связанных с биологическими процессами.

Список литературы

1. Mastenbroek S., Twisk M., van der Veen F., Repping S. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs // Hum. Reprod. Update – 2011. – Vol. 17. – P. 454–466.
2. Harton G.L., Magli M.C., Lundin K., Montag M., Lemmen J., Harper J.C. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group–best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS) // Hum. Reprod. – 2011. – Vol. 26. – P. 41–46.
3. Verlinsky Y., Tur-Kaspa I., Cieslak J., Bernal A., Morris R., Taranissi M., Kaplan B., Kuliev A. Preimplantation testing for chromosomal disorders improves reproductive outcome of poor-prognosis patients // Reprod. Biomed. Online – 2005. – Vol. 11. – P. 219–225.
4. Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P. Sperm and blastomere aneuploidy detection in reproductive genetics and medicine // J. Histochem. Cytochem. – 2005. – Vol. 53. – P. 261–267.
5. Hassold T., Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy // Nat. Rev. Genet. – 2001. – Vol. 2. – P. 280–291.
6. Fragouli E., Lenzi M., Ross R., Katz-Jaffe M., Schoolcraft W.B., Wells D. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage // Hum. Reprod. – 2008. – Vol. 23. – P. 2596–2608.
7. Martin R.H. Cytogenetic determinants of male fertility // Hum. Reprod. Update – 2008. – Vol. 14. – P. 379–390.
8. Mir P., Rodrigo L., Mateu E., Peinado V., Milán M., Mercader A., Buendia P., Delgado A., Pellicer A., Remohí J., Rubio C. Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening // Hum. Reprod. – 2010. – Vol. 25. – P. 1812–1817.
9. Harper J.C., Wilton L., Traeger-Synodinos J., Goossens V., Moutou C., SenGupta S.B., Pehlivan Budak T., Renwick P., De Rycke M., Geraedts J.P., Harton G. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection // Hum. Reprod. Update. – 2012. – Vol. 18. – P. 234–247.
10. Staessen C., Verpoest W., Donoso P., Haentjens P., Liebaers I., Devroey P. Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer // Hum. Reprod. – 2008. – Vol. 23. – P. 2818–2825.
11. Van Echten-Arends J., Mastenbroek S., Sikkema-Raddatz B., Korevaar J.C., Heineman M.J., van der Veen F., Repping S. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review // Hum. Reprod. Update – 2011. – Vol. 17. – P. 620–627.
12. Twisk M., Mastenbroek S., Hoek A., Heineman M.J., van der Veen F., Bossuyt P.M., Repping S., Korevaar J.C. No beneficial effect of preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age with a high risk for embryonic aneuploidy // Hum. Reprod. – 2008. – Vol. 23. – P. 2813–2817.
13. Dozortsev D.I., McGinnis K.T. An improved fixation technique for fluorescence *in situ* hybridization for preimplantation genetic diagnosis // Fertil. Steril. – 2001. – Vol. 76. – P. 186–188.
14. Денисенко С.В., Дарий А.С., Кононенко М.И., Зерова-Любимова Т.Э. Эффективность применения преимплантационной диагностики в практике вспомогательных репродуктивных технологий // Репродуктивное здоровье женщины – 2007. – Vol. 3. – С. 171–175.
15. Hardarson T., Caisander G., Sjøgren A., Hanson C., Hamberger L., Lundin K. A morphological and chromosomal study of blastocysts developing from morphologically suboptimal human pre-

- embryos compared with control blastocysts // Hum. Reprod. – 2003. – Vol. 18. – P. 399–407.
16. Avo Santos M., Teklenburg G., Macklon N.S., Van Opstal D., Schuring-Blom G.H., Krijtenburg P.J., de Vreeden-Elbertse J., Fauser B.C., Baart E.B. The fate of the mosaic embryo: chromosomal constitution and development of Day 4, 5 and 8 human embryos // Hum. Reprod. – 2010. – Vol. 25. – P. 1916–1926.
 17. Wilton L., Thornhill A., Traeger-Synodinos J., Sermon K.D., Harper J.C. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD // Hum. Reprod. – 2009. – Vol. 24. – P. 1221–1228.
 18. Goossens V., De Rycke M., De Vos A., Staessen C., Michiels A., Verpoest W., Van Steirteghem A., Bertrand C., Liebaers I., Devroey P., Sermon K. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis // Hum. Reprod. – 2008. – Vol. 23. – P. 481–492.
 19. Haapaniemi Kouru K., Malmgren H., Norden-skjöld M., Fridström M., Csemiczky G., Blennow E. One-cell biopsy significantly improves the outcome of preimplantation genetic diagnosis (PGD) treatment: retrospective analysis of 569 PGD cycles at the Stockholm PGD centre // Hum. Reprod. – 2010. – Vol. 27. – P. 2843–2849.
 20. Kahraman S., Bağçe M., Samli H., Imirzahoğlu N., Yakisik K., Cengiz G., Dönmez E. Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. // Hum. Reprod. – 2000. – Vol. 15. – P. 2003–2007.
 21. Munne S., Sandalinas M., Escudero T., Márquez C., Cohen J. Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect // Reprod. Biomed. Online. – 2002. – Vol. 4. – P. 223–232.
 22. Werlin L., Rodi I., DeCherney A., Marelló E., Hill D., Munne S. Preimplantation genetic diagnosis as both as a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. // Fertil. Steril. – 2003. – Vol. 80. – P. 467–468.
 23. Staessen C., Platteau P., Van Assche E., Michiels A., Tournaye H., Camus M., Devroey P., Liebaers I., Van Steirteghem A. 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. – 2004. – Vol. 19. – P. 2849–2858.
 24. Platteau P., Staessen C., Michiels A., Van Steirteghem A., Liebaers I., Devroey P. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in women older than 37 years // Fertil. Steril. – 2005. – Vol. 84. – P. 319–324.
 25. Rubio C., Rodrigo L., Perez-Cano I., Mercader A., Mateu E., Buendia P., Remohi J., Simon C., Pellicer A. FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome // Reprod. Biomed. Online. – 2005. – Vol. 11. – P. 497–506.
 26. Debrock S., Melotte C., Spiessens C., Peeraer K., Vanneste E., Meeuwis L., Meuleman C., Frijns J.P., Vermeesch J.R., D'Hooghe T.M. Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial // Fertil. Steril. – 2010. – Vol. 93. – P. 364–373.
 27. Zamora S., Clavero A., Gonzalvo M.C., de Dios Luna Del Castillo J., Roldán-Nofuentes J.A., Mozas J., Castilla J.A. PGS-FISH in reproductive medicine and perspective directions for improvement: a systematic review // J. Assist. Reprod. Genet. – 2011. – Vol. 28. – P. 747–757.
 28. Huang A., Adusumalli J., Patel S., Liem J., Williams J. 3rd, Pisarska M.D. Prevalence of chromosomal mosaicism in pregnancies from couples with infertility // Fertil. Steril. – 2009. – Vol. 91. – P. 2355–2360.
 29. Mantikou E., Wong K.M., Repping S., Mastenbroek S. Molecular origin of mitotic aneuploidies in preimplantation embryos // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – Vol. 1822. – P. 1921–1930.
 30. Delhanty J.D. Mechanisms of aneuploidy induction in human oogenesis and early embryogenesis // Cytogenet. Genome. Res. – 2005. – Vol. 111. – P. 237–244.
 31. Bielanska M., Tan S.L., Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development *in vitro*: incidence, type, and relevance to embryo outcome // Hum. Reprod. – 2002. – Vol. 17. – P. 413–419.
 32. Hanson C., Hardarson T., Lundin K., Bergh C., Hillensjö T., Stevic J., Westin C., Selleskog U., Rogberg L., Wikland M. Re-analysis of 166 embryos not transferred after PGS with advanced reproductive maternal age as indication // Hum. Reprod. – 2009. – Vol. 24. – P. 2960–2964.
 33. Daphnis D.D., Delhanty J.D., Jerkovic S., Geyer J., Craft I., Harper J.C. Detailed FISH analysis of day 5 human embryos reveals the mechanisms leading to mosaic aneuploidy // Hum. Reprod. – 2005. – Vol. 20. – P. 129–137.
 34. Baart E.B., Martini E., van den Berg I., Macklon N.S., Galjaard R.J., Fauser B.C., Van Opstal D. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF // Hum. Reprod. – 2006. – Vol. 21. – P. 223–233.

35. Vanneste E., Voet T., Le Caignec C., Ampe M., Konings P., Melotte C., Debrock S., Amyere M., Vikkula M., Schuit F., Fryns J.P., Verbeke G., D'Hooghe T., Moreau Y., Vermeesch J.R. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 15. – P. 577–583.
36. Scriven P.N., Bossuyt P.M. Diagnostic accuracy: theoretical models for preimplantation genetic testing of a single nucleus using the fluorescence *in situ* hybridization technique // *Hum. Reprod.* – 2010. – Vol. 25. – P. 2622–2628.
37. Daphnis D.D., Fragouli E., Economou K., Jerkovic S., Craft I.L., Delhanty J.D.A., Harper J.C. Analysis of the evolution of chromosome abnormalities in human embryos from day 3 to 5 using CGH and FISH // *Mol Hum Reprod.* – 2008. – Vol. 14. – P. 117–125.
38. Wells D., Alfaraulli S., Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH // *Mol. Hum. Reprod.* – 2008. – Vol. 14. – P. 703–710.
39. Johnson D.S., Gemelos G., Baner J., Ryan A., Cinnioglu C., Banjevic M., Ross R., Alper M., Barrett B., Frederick J., Potter D., Behr B., Rabinowitz M. Preclinical validation of a microarray method for full molecular karyotyping of blastomeres in a 24-h protocol // *Hum. Reprod.* – 2010. – Vol. 25. – P. 1066–1075.
40. Bisignano A., Wells D., Harton G., Munné S. PGD and aneuploidy screening for 24 chromosomes: advantages and disadvantages of competing platforms // *Reprod. Biomed. Online* – 2011. – Vol. 23. – P. 677–685.
41. Keskinetepe L., Sher G., Keskinetepe M. Reproductive oocyte/embryo genetic analysis: comparison between fluorescence *in-situ* hybridization and comparative genomic hybridization // *Reprod. Biomed. Online*. – 2007 – Vol. 15. – P. 303–309.
42. Bielanska M.M., Jin S., Bernier M., Tan S.L., Ao A. Diploid-aneuploid mosaicism in human embryos cultured to the blastocyst stage // *Fertil. Steril.* – 2005. – Vol. 84. – P. 336–342.
43. Jourov I. Y., Vorsanova S.G., Yurov Yu.B. Chromosomal mosaicism goes global // *Mol. Cytogenet.* – 2008. – Vol. 1. – P. 1–26.
44. Jacod B.C., Lichtenbelt K.D., Schuring-Blom G.H., Laven J.S.E., van Opstal D., Eijkemans M.J.C., Macklon N.S. and on behalf of the IVF-CPM Study Group Does confined placental mosaicism account for adverse perinatal outcomes in IVF pregnancies? // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol. 23. – P. 1107–1112.
45. Lebedev I. Mosaic aneuploidy in early fetal losses // *Cytogenet. Genome Res.* – 2011. – Vol. 133. – P. 169–183.
46. Vorsanova S.G., Kolotii A.D., Jourov I.Y., Monakhov V.V., Kirillova E.A., Soloviev I.V., Yurov Yu.B. Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis // *J. Histochem Cytochem.* – 2005. – Vol. 53. – P. 375–380.
47. Hernandez E.R. What next for preimplantation genetic screening? Beyond aneuploidy // *Hum. Reprod.* – 2009. – Vol. 24. – P. 1538–1541.
48. Devroey P., Fauser B.C.J.M., Diedrich K. Approaches to improve the diagnosis and management of infertility // *Hum. Reprod. Update.* – 2009. – Vol. 15. – P. 391–408.
49. Eggan K., Rode A., Jentsch I., Samuel C., Hennek T., Tintrup H., Zevnik B., Erwin J., Loring J., Jackson-Grusby L., Speicher M.R., Kuehn R., Jaenisch R. Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation // *Nat. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 455–459.
50. Geraedts J., Montag M., Magli M.C., Repping S., Handside A., Staessen C., Harper J., Schmutzler A., Collins J., Goossens V., van der Ven H., Vesela K., Gianaroli L. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol. 26. – P. 3173–3180.
51. Magli M.C., Montag M., Koster M., Muzi L., Geraedts J., Collins J., Goossens V., Handside A., Harper J., Repping S., Schmutzler A., Vesela K., Gianaroli L. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part II: technical aspects // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol. 26. – P. 3183–3185.

Представлена Л.Л. Лукаш
Поступила 03.02.2014

ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ ПРЕІМПЛАНТАЦІЙНОГО СКРИНІНГУ У ПРОГРАММАХ ЕКЗ С ICSI У ПОДРУЖНИХ ПАР СТАРШИХ 35 РОКІВ

М.І. Кононенко¹, С.В. Денисенко¹,
Н.Г. Горovenko²

¹Клініка проблем планування сім'ї
Україна, 03037, Київ, Червонозоряний проспект, 17
²Національна Медична Академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика
Україна, 04112, Київ, вул. Дорогожицька, 9
e-mail: info@icsi.com.ua

Мета. Провести ретроспективний аналіз результатів преімплантацийного скринінгу ембріонів на 3-й день розвитку *in vitro*, які були

отримані в програмах ЕКЗ з ICSI у подружніх пар старшої вікової категорії. **Методи.** Клінічне обстеження, сперміологічний аналіз, цитогенетичне дослідження, морфологічна оцінка ембріонів, флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH). **Результати.** Проведена оцінка ефективності методу виявлення геномних мутацій до імплантації. Молекулярно-цитогенетичний аналіз всіх клітин ембріонів, які були віднесені до анеуплоїдних після преимплантаційної діагностики, показав переважність мозаїчних ембріонів (63,6 %). **Висновки.** Результати власних та літературних даних свідчать про те, що впровадження тестування в якості скринінгу найбільш поширених геномних мутацій на преимплантаційному рівні недоцільно в зв'язку з високим рівнем мозаїцизму.

Ключові слова: преимплантаційний генетичний скринінг, FISH, анеуплоїдія, мозаїцизм, віковий фактор.

EVALUATION OF PREIMPLANTATION GENETIC SCREENING AFTER IVF WITH ICSI IN COUPLES OVER 35 YEARS OLD

M.I. Kononenko¹, S.V. Denisenko¹, N.G. Gorovenko²

¹Human Reproductive Problems Clinic
Ukraine, 03037, Kyiv, Chervonozoryany Prospekt, 17
²P.L.Shupik National medical academy of post-graduate education 9
Ukraine, 04112, Kyiv, Dorohozhytska St., 9
e-mail: info@icsi.com.ua

Aim. Aim is to perform the retrospective analysis of the results of preimplantation screening in embryos at the 3rd day of development *in vitro* obtained in programs of IVF with ICSI in couples of older age groups. **Methods.** Clinical examination, spermogram, cytogenetic analysis, morphological evaluation of embryo, fluorescent *in situ* hybridization (FISH). **Results.** Evaluation of the efficiency of the method to identify genomic mutations in the embryo prior to implantation has been performed. Molecular cytogenetic analysis of all cells of embryos classified as aneuploid after preimplantation diagnosis, showed the prevalence of mosaic embryos (63.6 %). **Conclusions.** The results of own and literature data indicate that the introduction of testing as a screening for the most common genomic mutations at the preimplantation level is impractical due to high level of mosaicism.

Key words: preimplantation genetic screening, FISH, aneuploidy, mosaicism, age factor.